

## Tesis de Posgrado

# Evidencias sobre la existencia de la enzima óxido nítrico sintasa en el espermatozoide murino y su participación en el proceso de fertilización

Herrero, María Belén

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Herrero, María Belén. (1996). Evidencias sobre la existencia de la enzima óxido nítrico sintasa en el espermatozoide murino y su participación en el proceso de fertilización. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2895\\_Herrero.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2895_Herrero.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Herrero, María Belén. "Evidencias sobre la existencia de la enzima óxido nítrico sintasa en el espermatozoide murino y su participación en el proceso de fertilización". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2895\\_Herrero.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2895_Herrero.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

"Evidencias sobre la existencia de la enzima óxido nítrico sintasa en el  
espermatozoide murino y su participación en el proceso de fertilización"

Autor: María Belén Herrero

Director: Juan Marcelo Viggiano

Consejera de Estudios: María Cristina Maggese

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Area: Ciencias Biológicas

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

1996

52

**"Evidence that nitric oxide synthase is present in mouse spermatozoa and  
that it is involved in the fertilization process"**

*Palabras claves:* espermatozoide, ratón, óxido nítrico, óxido nítrico sintasa, reacción acrosomal, fertilización, prostaglandinas e hidroxiácidos.

*Keywords:* spermatozoa, mouse, nitric oxide, nitric oxide synthase, acrosome reaction, fertilization, prostaglandins and hydroxyacids.

A mis seres queridos.

Bien puede ser que nuestra vida breve sea un reflejo de lo divino.

Jorge Luis Borges. Los Conjurados.

## AGRADECIMIENTOS

A los profesores de la Universidad de Buenos Aires, porque con su ejemplo, me ayudaron a no vacilar en mi elección.

Al CONICET por ofrecerme la oportunidad de poder realizar lo que me apasiona: la investigación.

A la Dra. Martha Fernández de Gimeno, quien desde un primer momento me brindó su apoyo y me contagió siempre su optimismo.

Al Dr. Juan Marcelo Viggiano, por la dirección de esta tesis y por ser un compañero siempre paciente ante mis cuestionamientos.

A la Dra. Valeria Rettori, porque a través de su dedicación por la investigación me da fuerzas para seguir en esta aventura.

A la Dra. María Cristina Maggese, por su buena disposición para ser mi Consejera de Tesis.

A mis queridas compañeras de trabajo:

Mariel Boquet, una amiga de verdad.

Elisa Cebal, trabajadora incansable, que en los momentos difíciles de mi trabajo me ayudó a salir adelante.

Silvina Perez Martinez que casi sin conocernos, no dudó en enseñarme sus conocimientos y así enriquecer este trabajo de tesis.

Ana María Franchi, por su ayuda incondicional en los momentos difíciles.

Alicia Faletti, por su paciencia y su siempre buena predisposición para enseñarme.

Alicia Motta , Virginia Novaro y Andrea Lasserre por su buen compañerismo.

Marcela Chaud por darme una palabra de apoyo en tiempos tristes.

Alicia Jawerbaum, por darme ejemplo con su constancia y Elida Gonzalez con su eficiencia.

Griselda Canteros, una compañera que estuvo dispuesta a ayudarme.

Ramona Morales, por su simplicidad ante las cosas.

También quiero agradecer a Martín Berón de Astrada y Julio Fernández Cueto, a quien les tengo un gran afecto.

A mis compañeros del CEFYBO, porque cada uno a su manera enriqueció mis días de trabajo.

A Cristina Cerquetti y Magdalena Gherardi, por su cálida ayuda.

A Ana Inés, Isabel, Beatriz, Alejandra y Tania, porque siempre estuvieron dispuestas a facilitarme las cosas.

Al personal de mantenimiento, en especial a Ramón Karpluck por su gran colaboración.

A mis padres: Hernán y Angela y a mi hermano tan querido Hernán Ezequiel, por el amor de todos los días.

A Mamana, que cada domingo me demuestra su afecto con la frescura de una rosa.

A mi abuela Eugenia y mis abuelos José y Teófilo, que hoy y siempre están en mi corazón.

A Pori, por su cariño incondicional.

A Haydé, por su generosa compañía.

A mis amigas Anita, Jaqui, Mariana y Mary. Juntas nos damos fuerzas para seguir el Camino.

A mis amigos de la Facu: Cristina Negritto, Sergio Alvarez, Pablo Lenzi, Mariana Costaguta, Mariana Viscarret y Santiago Werbahj, por los hermosos y entrañables momentos compartidos.

A Juan, por su paciencia, dedicación y comprensión para conmigo.

El contenido de este trabajo de tesis ha sido parcialmente publicado en:

- . M.B. Herrero, E. Cebral, M. Boquet, J.M. Viggiano, A. Vitullo y M.F. Gimeno. Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation (1994) *Acta Physiologica Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana* **44**: 65-9.
- . M.B. Herrero, A.M. Franchi y M.F. Gimeno. Mouse spermatozoa can synthesize PGE2 and 5-HETE *in vitro*: stimulatory action of nitric oxide (1995) *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **53**: 347-50.
- . M.B. Herrero, J.M. Viggiano, S. Perez Martinez y M.F. Gimeno. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the outcome of in vitro fertilization in the mouse (1996) *Reproduction, Fertility and Development* **8**: 301-4.
- . M.B. Herrero, S. Perez Martinez, J.M. Viggiano, J.M. Polak y M.F. Gimeno. Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa (1996) *Reproduction, Fertility and Development* **8**: 931-4.
- . J.M. Viggiano, M.B. Herrero, S. Perez Martinez y M.F. Gimeno. Analysis of the effect of nitric oxide synthase inhibition on mouse sperm employing a modified staining method for assessment of acrosome reaction (1996) *Journal of Andrology* (en prensa).



## RESUMEN

Virtualmente todas las células de mamíferos están bajo la influencia del radical libre denominado óxido nítrico (NO). Las enzimas responsables de la síntesis del NO se conocen como óxido nítrico sintasas (NOS ó NO-sintasas). En mamíferos, se han clonado tres isoenzimas de la NO-sintasa. Las isoformas neuronal y endotelial son dependientes de  $Ca^{++}$  y se expresan constitutivamente, mientras que la isoforma inducible es  $Ca^{++}$  independiente y se induce en presencia de lipopolisacáridos y citocinas. Todas las isoformas pertenecen a la familia de los citocromos P-450, utilizan L-arginina como sustrato, con oxígeno molecular y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida (NADPH) como co-sustratos.

Las funciones del NO fueron descriptas primeramente en tres sistemas fisiológicos (vascular, nervioso e inmune) y a partir de dicho estudio se fueron descubriendo funciones del NO en otros sistemas como el reproductor, respiratorio y excretor.

En reproducción, se vió que el NO induce la erección peniana, estimula al factor liberador de la hormona luteinizante (LH-RH) y modula la síntesis de prostaglandinas uterinas y ováricas durante la luteólisis en la rata. Sin embargo, hasta el momento no se había descripto la participación del NO en el proceso de fertilización.

En el presente trabajo se presentan evidencias de la existencia de la enzima NO-sintasa en la gameta masculina murina y su participación en la fertilización *in vitro*.

Mediante ensayos farmacológicos determinamos que la adición de inhibidores específicos de la NO-sintasa ( $N^G$ -nitro-L-arginina ( $NO_2$ -arg) ó  $N^G$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)) durante el proceso de capacitación *in vitro* disminuye el porcentaje de ovocitos fertilizados. Esta inhibición es estereoespecífica y depende de la concentración.

Dado que el proceso de fertilización se encuentra afectado en presencia de L-NAME y  $NO_2$ -arg, medimos la motilidad espermática y el patrón de hiperactivación. A los 120 min de incubación, el L-NAME disminuye el porcentaje de espermatozoides móviles e hiperactivados, mientras que un generador de NO como el nitroprusiato de sodio (NP) acelera estos parámetros de manera concentración dependiente.

Considerando que el NO también podía participar en la reacción acrosomal, medimos el efecto del L-NAME sobre espermatozoides reaccionados espontáneamente ó en presencia de un inductor fisiológico como la progesterona. En estos casos, la exocitosis acrosomal también se halla inhibida; la inhibición es estereoespecífica y depende de la concentración. Contrariamente, 0.1 mM de spermine-NONOate (generador de NO) estimula la reacción acrosomal en

espermatozoides previamente capacitados a niveles semejantes a los obtenidos con 15  $\mu$ M de progesterona.

Luego de los ensayos farmacológicos, evidenciamos la presencia de la NO-sintasa espermática mediante ensayos inmunológicos. Por inmunofluorescencia indirecta localizamos la NO-sintasa en el acrosoma y en la cola de espermatozoides no capacitados. Durante la capacitación, la fluorescencia desaparece del acrosoma y se mantiene en el flagelo, otorgando a esta enzima un potencial significado fisiológico en el proceso de capacitación y/o de reacción acrosomal. Seguidamente, realizamos ensayos de Western Blot, los cuales nos permitieron demostrar que anticuerpos anti-NOS neuronal, endotelial e inducible reconocen una única fracción proteica de 140 kD bajo condiciones desnaturalizantes y no reductoras en espermatozoides frescos de ratón.

Cuando realizamos los experimentos cinéticos, detectamos la presencia de formación de NO, medida como conversión de L-arginina a L-citrulina en espermatozoides intactos y vivos (condiciones *in vivo*). Los espermatozoides sintetizan NO durante el proceso de capacitación alcanzando un plateau a los 120-180 min de incubación. Además, la producción de NO depende de la concentración de L-arginina presente en el medio de incubación y es inhibida por L-NAME pero no por aminoguanidina (inhibidor específico para la NO-sintasa de carácter inducible), sugiriendo la existencia de una NO-sintasa espermática de carácter constitutivo.

Considerando que en los ensayos farmacológicos evidenciamos la participación de la NO-sintasa del espermatozoide en la exocitosis acrosomal inducida por progesterona, se estudió también la modulación de este esteroide sobre la formación de NO en espermatozoides capacitados. Así, observamos que 15  $\mu$ M de progesterona estimula directamente la síntesis de NO durante el período ensayado (90-120 min).

Basándonos en trabajos realizados en nuestro laboratorio intentamos relacionar al NO con la síntesis de prostaglandinas e hidroxiácidos. Para ello, en primer término, demostramos que los espermatozoides de ratón son capaces de sintetizar PGE<sub>2</sub> e hidroxiácido 5-HETE y luego observamos que el NP estimula la síntesis de estos metabolitos en la gameta masculina. Sin embargo, la síntesis basal de prostaglandinas no se ve modificada en presencia de L-NAME.

Los resultados de este trabajo evidencian por primera vez la presencia de la NO-sintasa en el espermatozoide de ratón y demuestran su participación en el proceso de fertilización, modulando la motilidad espermática y la exocitosis acrosomal. Podemos afirmar entonces, que el NO sintetizado por la NO-sintasa espermática, es necesario para que el espermatozoide pueda expresar su plena capacidad fertilizante *in vitro*.

## SUMMARY

Mammalian cells are all virtually exposed to the action of nitric oxide (NO). Nitric oxide synthases (NOS or NO-synthases) are the enzymes that catalyze the production of NO. Three distinct isoforms of NO-synthase have been cloned in mammals. The neuronal and the endothelial isoforms are  $\text{Ca}^{++}$ -dependent and are constitutively expressed while the inducible isoform does not depend on  $\text{Ca}^{++}$  and is induced with bacterial products and cytokines.

NO actions have been previously described in the vascular, the nervous and the immune systems. However, many other functions are being shown in the reproductive, the respiratory and the urinary systems.

In the reproductive field, it was found that NO induces penis erection, stimulates LH-RH factor and modulates prostaglandins synthesis in the rat uterus. Nevertheless, till now it was not described the role of NO in the fertilization process.

Our results show that NO-synthase inhibitors ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina ( $\text{NO}_2$ -arg) ó  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)) added at the onset of capacitation reduce the percentage of fertilized oocytes. This inhibition is stereospecific and depends on the concentration. Moreover, we demonstrate that L-NAME reduces the percentage of motile and hyperactivated spermatozoa at 120 min of incubation, while a nitric oxide donor named sodium nitroprusside (NP) accelerates hyperactivation in a concentration manner.

We were then interested in searching the effect of NO-synthase inhibitors on the spontaneous and progesterone-induced acrosome reaction. In these cases, the acrosomal exocytosis is inhibited, the inhibition is stereospecific and depends on the concentration. In contrast, 0.1 mM spermine-NONOate (NO donor) stimulates the progesterone-induced acrosome reaction.

Then, we evidence the presence of sperm NO-synthase by immunological assays. Thus, we localized NO-synthase in the acrosome and tail of non capacitated mouse spermatozoa by the immunofluorescence technique. During capacitation the fluorescence disappears in the acrosome and it persists in the tail. Besides, under denaturing and non reducing conditions, Western Blot analysis of solubilized sperm proteins reveal a unique band of  $\text{Mr}=140$  kD with the three NO-synthase antisera tested (neuronal, endothelial and inducible isoforms).

By means of kinetics assays, we detect the production of NO by intact spermatozoa (*in vivo* conditions). During the capacitation period (120 min),  $10^7$  spermatozoa are capable to synthesize  $7\pm 2$  picomoles of NO. Besides, NO formation depends on the incubation period

and on the concentration of L-arginine present in the incubation medium. Different concentrations of L-NAME but not aminoguanidine, inhibit L-[<sup>14</sup>C]citrulline formation, suggesting that sperm NO-synthase is a constitutive isoform.

In the pharmacological assays, we demonstrated that NO-synthase may be involved in the progesterone-induced acrosome reaction; so we studied the effect of this steroid on the production of NO by capacitated sperm. In this set of experiments we show that 15  $\mu$ M progesterone stimulates NO formation in spermatozoa.

Based on studies done in our laboratory, we finally intend to relate NO to prostaglandins and hydroxyacids synthesis. We first demonstrate that mouse spermatozoa synthesize PGE<sub>2</sub> and 5-HETE and that these synthesis are stimulated by NP. However, L-NAME does not inhibit these basal synthesis.

The results presented here evidence for the first time the presence of NO-synthase in the murine male gamete and the role of this enzyme in the fertilization process: sperm NO-synthase modulates sperm motility and the acrosomal exocytosis. So, we can say that NO, synthesized by sperm NO-synthase is necessary for spermatozoa to express its full fertilizing ability.

## ABREVIATURAS

AA	: Acido araquidónico
ABF	: Azul de Bromo Fenol
ADN	: Acido desoxirribonucleico
AMPc	: Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico
arg	: Arginina
ARN	: Acido ribonucleico
ATP	: Adenosín 5'-trifosfato
BCIP	: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
βME	: Beta-Mercaptoetanol
BSA	: Suero Albúmina Bovina
Ca <sup>++</sup>	: Calcio
CE <sub>50</sub>	: Concentración efectiva 50
Ci	: Curi
cpm	: cuentas por minuto
CSF	: Factor citostático
CTC	: Clortetraciclina
DAG	: Diacilglicerol
DMSO	: Dimetilsulfóxido
EDRF	: Factor relajante de endotelio
FITC	: Isotiosanato de fluoresceína
GC	: Guanilato ciclasa
GMPc	: Guanosín 3',5'-monofosfato cíclico
Hb	: Hemoglobina
hCG	: Gonadotrofina coriónica humana
HCl	: Acido clorhídrico
HDL	: High density lipoprotein
HETE	: Hidroxi-eicosatetraenoico
HOS	: Medio Hipo-osmótico
h/hs	: Hora/s
IFI	: Inmunofluorescencia indirecta
IFN	: Interferón

Ig(s)	: Inmunoglobulina(s)
IP <sub>3</sub>	: 1-4-5 Inositoltrifosfato
kD	: Kilodaltons
LDL	: Low density lipoprotein
LPS	: Lipopolisacárido
LTs	: Leucotrienos
mA	: Miliamper
MF	: Medio de fertilización adicionado con albúmina
MgCl <sub>2</sub>	: Cloruro de Magnesio
min	: Minuto/s
MPF	: Factor promotor de la metafase
M <sub>R</sub>	: Peso molecular relativo
NaCl	: Cloruro de sodio
D-NAME	: N <sup>G</sup> -Nitro-D-Arginina-metil-éster
L-NAME	: N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginina-metil-éster
NBT	: Azul de p-nitrotetrazolio
NC	: Nitrocelulosa
NO <sub>2</sub> -arg	: L-N <sup>G</sup> -Nitro-Arginina
NO	: Oxido Nítrico
NOS ó	
NO-sintasa	: Oxido Nítrico Sintasa
NP	: Nitroprusiato de Sodio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Anión superóxido
ONOO	: Peroxinitrito
P	: Progesterona
PAGE	: Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	: Buffer fosfato salino
PLA <sub>2</sub>	: Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	: Fosfolipasa C
PMSG	: Gonadotrofina de suero de yegua preñada
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	: Prostaglandina F <sub>2α</sub>
PG(s)	: Prostaglandina(s)

p/v	: peso en volumen
R <sub>r</sub>	: Relación de frentes
ROS	: Especies reactivas del oxígeno
rpm	: revoluciones por minuto
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
S.E.M.	: Error Standard Medio
SOD	: Superóxido dismutasa
TBS	: Buffer Tris salino
TBST	: Buffer Tris salino adicionado con Tween 20
TCA	: Tricloroacético
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletiléndiamina
Tris	: Tris (hidroximetil)-amino metano
TXB <sub>2</sub>	: Tromboxano B <sub>2</sub>
UI	: Unidades Internacionales
v/v	: volumen en volumen
ZP	: Zona pelúcida

## INDICE

Página

### CAPITULO I: INTRODUCCION

1. Fertilización en mamíferos	1
1.1. El espermatozoide	1
1.1.1. Morfología del espermatozoide	1
1.1.2. La membrana plasmática	3
1.1.3. La cabeza	3
1.1.4. El flagelo	5
1.2. Maduración epididimaria	5
1.3. Capacitación espermática	8
1.3.1. Capacitación in vivo	9
1.3.2. Eventos que ocurren durante la capacitación	9
1.3.2.1. Remoción del plasma seminal	9
1.3.2.2. Cambios en la membrana plasmática	10
1.3.2.3. Cambios metabólicos	11
1.3.2.4. Cambios en la motilidad del espermatozoide	11
1.3.3 Capacitación <i>in vitro</i>	12
1.4. Penetración espermática a través del cúmulus	12
1.5. Interacción espermatozoide-zona pelúcida	13
1.5.1. Unión zona pelúcida-espermatozoide	14
1.5.1.1. Receptores en la zona pelúcida	14
1.5.1.2. Receptores en el espermatozoide	15



1.5.2. Reacción acrosomal	15
1.5.2.1. Clasificación	17
1.5.2.2. Reacción acrosomal inducida por progesterona	18
1.5.2.3. Mecanismos involucrados en la reacción acrosomal	19
1.6. Fusión ovocito-espermatozoide	19
1.7. Activación del ovocito	20
1.7.1. Cambio en el potencial de membrana y movilización de $\text{Ca}^{++}$	20
1.7.2. Reacción cortical	21
1.7.3. Desarresto de la meiosis	21
1.8. Descondensación nuclear del espermatozoide en el ooplasma	22
1.9. Formación de pronúcleos y singamia	23
2. El óxido nítrico como mensajero celular en mamíferos	24
2.1. Introducción	24
2.2. Biosíntesis del óxido nítrico	24
2.3. Enzimas óxido nítrico sintasas (NO-sintasas) en mamíferos	25
2.3.1. Caracterización de las tres isoformas de NO-sintasas	25
2.3.1.1. Isoforma I	25
2.3.1.2. Isoforma II	27
2.3.1.3. Isoforma III	27
2.3.2. Regulación fisiológica de las NO-sintasas	27
2.3.2.1. Isoforma I	28
2.3.2.2. Isoforma II	28
2.3.2.3. Isoforma III	29

2.3.3. Regulación farmacológica de la síntesis de óxido nítrico	30
2.4. Blancos moleculares del óxido nítrico	31
2.4.1. Proteínas con grupos metálicos	31
2.4.2. Radicales libres	32
2.5. Fisiología del óxido nítrico	32
2.5.1. El óxido nítrico en el sistema vascular	33
2.5.2. El óxido nítrico en el sistema nervioso	33
2.5.3. El óxido nítrico en respuestas inmunológicas	33
2.5.4. Óxido nítrico y reproducción	34
2.5.5. El óxido nítrico en otros tejidos y células	34
3. Prostaglandinas y compuestos relacionados	35
3.1. Introducción	35
3.2. Biosíntesis de los eicosanoides	36
3.2.1. Relación con los ácidos grasos esenciales	36
3.2.2. Nomenclatura	36
3.2.3. Cascada del ácido araquidónico	38
3.2.3.1. Origen del ácido araquidónico	38
3.2.3.2. Formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos	38
3.2.4. Metabolismo de los eicosanoides	40
3.3. Interacción entre las prostaglandinas y el óxido nítrico	44
3.4. Efectos biológicos de los eicosanoides en el espermatozoide	44
4. Hipótesis de trabajo	46

## CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

1. Animales y medio utilizados	49
1.1. Animales	49
1.2. Medio de cultivo definido	49
2. Técnica de fertilización <i>in vitro</i>	50
2.1. Preparación de las cápsulas para la fertilización	50
2.2. Preparación de las gametas	50
2.2.1. Preparación de la suspensión de espermatozoides	50
2.2.2. Obtención de los ovocitos	51
2.3. Inseminación de gametas. Observación de pronúcleos	52
3. Medición de la motilidad espermática	52
4. Determinación de la reacción acrosomal por HOS-Spermac	53
4.1. Correlación entre viabilidad espermática vs. "swelling"	55
4.2. Comparación entre el ensayo de fluorescencia de la clortetraciclina (CTC) y el método HOS-Spermac	55
4.3. Medición de la reacción acrosomal espontánea	59
4.4. Medición de la reacción acrosomal inducida por progesterona	59
5. Localización por inmunofluorescencia indirecta de la NO-sintasa espermática	59
6 Caracterización inmunológica de la NO-sintasa espermática por Western Blot	60
6.1. Solubilización de proteínas espermáticas murinas	60
6.2. Solubilización de proteínas de cerebro y cerebelo de rata	61

6.3. Análisis por Western Blot	61
7. Conversión de L-[ <sup>14</sup> ]arginina a L-[ <sup>14</sup> ]citrulina y producción de óxido nítrico por el espermatozoide	64
8. Determinación de la síntesis de prostaglandinas e hidroxiácidos espermáticos	65
9. Drogas utilizadas	66
10. Análisis estadístico de los resultados	67

### CAPITULO III: RESULTADOS

1. Efecto del óxido nítrico en la motilidad espermática murina	69
1.1. Motilidad general en presencia de nitroprusiato de sodio	69
1.2. Hiperactivación con nitroprusiato de sodio	73
2. Evidencias farmacológicas de la presencia de la enzima NO-sintasa en el espermatozoide murino	76
2.1. Participación de la NO-sintasa espermática en la fertilización <i>in vitro</i>	76
2.1.1. Efecto de inhibidores de la NO-sintasa en la fertilización	76
1.2. Efecto de diferentes concentraciones de L-NAME en la fertilización <i>in vitro</i>	78
2.1.3. Efecto del desplazamiento de L-NAME por L-arginina en la fertilización <i>in vitro</i>	78
2.2. Participación de la NO-sintasa en la motilidad espermática	81
2.2.1. Efecto de la inhibición de la NO-sintasa sobre la motilidad del espermatozoide	81
2.3. La NO-sintasa espermática participa en la reacción acrosomal espontánea	81

2.3.1. Perfil temporal de la reacción acrosomal espontánea	81
2.3.2. Efecto de la inhibición de la NO-sintasa en la reacción acrosomal espontánea	83
2.3.2.1. Efecto de diferentes concentraciones de L-NAME sobre la reacción acrosomal espontánea	83
2.3.2.2. Efecto del desplazamiento del L-NAME por L- y D-arginina sobre la reacción acrosomal espontánea	83
2.4. La NO-sintasa espermática interviene en la reacción acrosomal inducida por progesterona	87
2.4.1. Efecto de inhibidores de la NO-sintasa en la reacción acrosomal inducida por progesterona	87
2.4.2. El óxido nítrico estimula directamente la reacción acrosomal	90
3. Evidencias inmunológicas de la presencia de la NO-sintasa en el espermatozoide murino	95
3.1. Localización celular de la NO-sintasa espermática por inmunofluorescencia indirecta	95
3.1.1. Variación de los patrones de localización de la NO-sintasa en la capacitación <i>in vitro</i>	97
3.2. Identificación por Western Blot de la NO-sintasa espermática	97
4. Evidencias bioquímicas de la presencia de la NO-sintasa en el espermatozoide murino	100
4.1. Conversión de L-[ <sup>14</sup> ]arginina a L-[ <sup>14</sup> ]citrulina y producción de óxido nítrico por espermatozoides murinos	100

4.2. La progesterona estimula la formación de óxido nítrico en espermatozoides capacitados	104
5. Efecto del óxido nítrico en la síntesis de eicosanoides espermáticos	105
5.1. Síntesis de prostaglandinas e hidroxiácidos espermáticos	105
5.2. Estimulación del óxido nítrico en la síntesis de prostaglandinas e hidroxiácidos	105
5.3. Efecto del L-NAME en la síntesis de prostaglandinas e hidroxiácidos espermáticos	108
 CAPITULO IV: DISCUSION	
Discusión	111
 CAPITULO V: CONCLUSIONES	
Conclusiones	124
 CAPITULO VI: BIBLIOGRAFIA	
Bibliografía	126

# **CAPITULO I**

## **Introducción**

## 1. FERTILIZACION EN MAMIFEROS

La fertilización no es un proceso azaroso sino que requiere de múltiples factores a fin de coordinar el encuentro entre las gametas. Siendo las prostaglandinas y el óxido nítrico mensajeros que intervienen en numerosos sistemas fisiológicos, nos interesó conocer la posible relación de estos compuestos en la función espermática murina.

### 1.1. El espermatozoide

#### 1.1.1. Morfología del espermatozoide

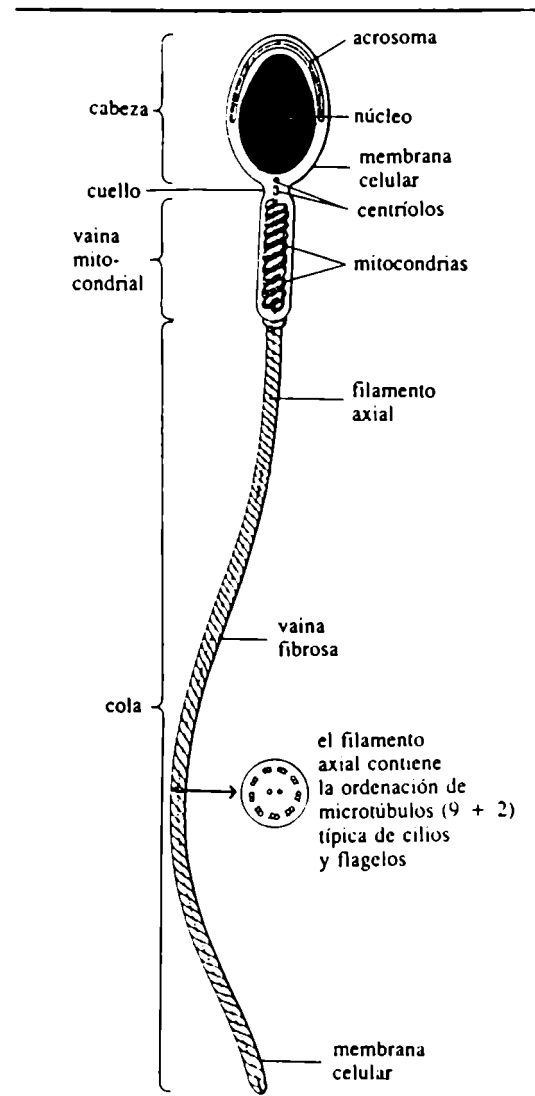
El espermatozoide es el producto final de la espermatogénesis, la cual ocurre en los túbulos seminíferos del testículo. La espermatogénesis involucra una serie de divisiones mitóticas de las espermatogonias, dos divisiones meióticas de los espermatocitos, un remodelamiento morfológico de la espermátide y la liberación de la célula libre en el lumen del tubo seminífero mediante el proceso conocido como espermiación.

La espermatogénesis produce una célula en la que tanto su estructura como su función están altamente diferenciadas y es al mismo tiempo totipotente; siendo capaz de combinarse con el ovocito para formar un nuevo individuo.

El espermatozoide de mamíferos tiene dos componentes principales: la cabeza y el flagelo. La cabeza está compuesta por un acrosoma, el núcleo, citoplasma y cantidades remanentes de estructuras del citoesqueleto. El acrosoma es un gránulo secretorio de gran tamaño que rodea y recubre la porción anterior del núcleo, que es haploide y cuya cromatina se encuentra muy condensada. El flagelo contiene un axonema central, mitocondrias y fibras densas, las cuales forman el citoesqueleto. La cabeza, al igual que el flagelo, está rodeada por la membrana plasmática y contiene muy poco citoplasma (Eddy, 1988) (*Figura 1.1*).

Las estructuras especializadas del espermatozoide son marcadores de su funcionalidad: el acrosoma contiene enzimas hidrolíticas esenciales para la fertilización y el flagelo posee la fuente de energía y la maquinaria necesaria para la motilidad. Estos componentes son los que permiten la fertilización, es decir, la entrada al ovocito del material genético que contiene el núcleo del espermatozoide. Esta entrada da lugar a la combinación de los pronúcleos haploides femenino y masculino, finalizando el proceso de fertilización e iniciando el de desarrollo.





**Figura I.1: Diagrama de un espermatozoide de mamífero.**

### 1.1.2. La membrana plasmática

La membrana plasmática del espermatozoide está subdividida en regiones muy bien delineadas que difieren tanto en su función como en su composición. La mayoría de las regiones se establece durante la espermiogénesis, aunque en algunas especies (cobayo) ocurre en el paso por el epidídimo.

Las regiones son el reflejo de la adquisición de funciones específicas determinadas por componentes de superficie y citoplasmáticos del espermatozoide. La formación de las regiones se pone de manifiesto estudiando la unión a lectinas (Koehler, 1981), la carga de superficie (Bedford, 1963), el perfil de crio fractura (Friend y Fawcett, 1974) y la unión de anticuerpos en la superficie del espermatozoide (Koehler, 1974).

En la mayoría de los espermatozoides de mamíferos, las principales regiones de la membrana plasmática asociadas a la zona de la cabeza son: el acrosoma anterior, el segmento ecuatorial y la región postacrosomal.

En el flagelo, las regiones de la membrana plasmática están ubicadas sobre la pieza media y la región posterior del flagelo. Entre estas regiones se encuentra el annulus, el cual es un anillo fibroso que rodea a los componentes del axonema y está firmemente unido a la membrana plasmática (Eddy, 1988).

### 1.1.3. La cabeza

La cabeza del espermatozoide de mamíferos está ocupada mayoritariamente por el núcleo y el acrosoma; el citoplasma se ve reducido a un volumen mínimo durante las últimas etapas de la espermatogénesis. El volumen del núcleo del espermatozoide es menor que el de las células somáticas y su cromatina está muy condensada.

El acrosoma se origina a partir del complejo de Golgi en la espermátide y es análogo a un lisosoma (Allison y Hartree, 1970): posee un pH ácido y contiene enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa, fosfatasa ácida, proacrosina y acrosina, fosfolipasa  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), collagenasa, neuraminidasa, calpaína II y fosfolipasa C (PLC), entre otras (Yanagimachi, 1994). Estas enzimas permiten al espermatozoide atravesar las distintas cubiertas del ovocito para luego fusionarse con el oolema (membrana plasmática del ovocito).

El acrosoma está formado por dos segmentos: el capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial (*Figura 1.2*). Se encuentra ubicado en la región anterior de la cabeza, justo por debajo

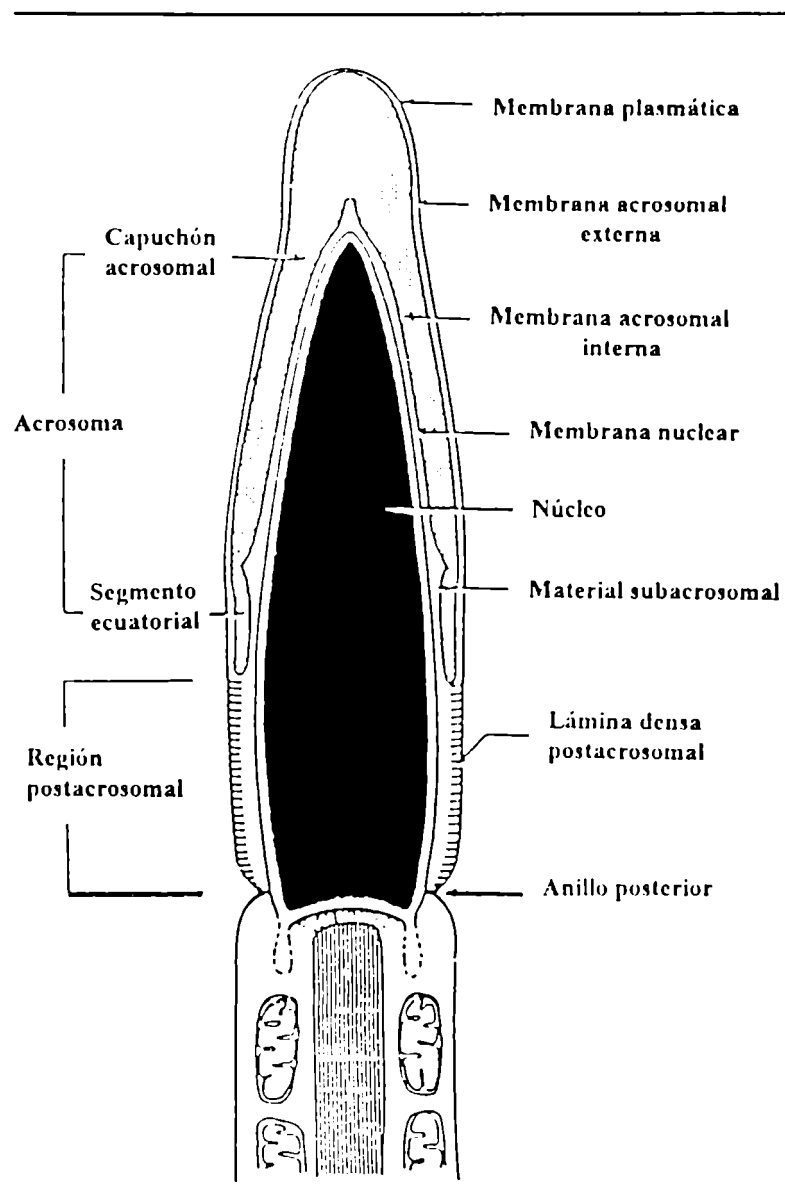


Figura 1.2: Representación esquemática de un corte sagital de la cabeza del espermatozoide.

de la membrana plasmática y está endentado por el núcleo en su parte posterior. La membrana acrosomal interna está firmemente adherida a la porción anterior de la envoltura nuclear, mientras que la membrana acrosomal externa se encuentra por debajo de la membrana plasmática.

Durante la reacción acrosomal, la membrana acrosomal externa se fusiona y se vesiculiza con la membrana plasmática, liberándose el contenido del acrosoma. En la mayoría de las especies, la membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial persisten hasta la fusión del espermatozoide con el ovocito.

#### **1.1.4. El flagelo**

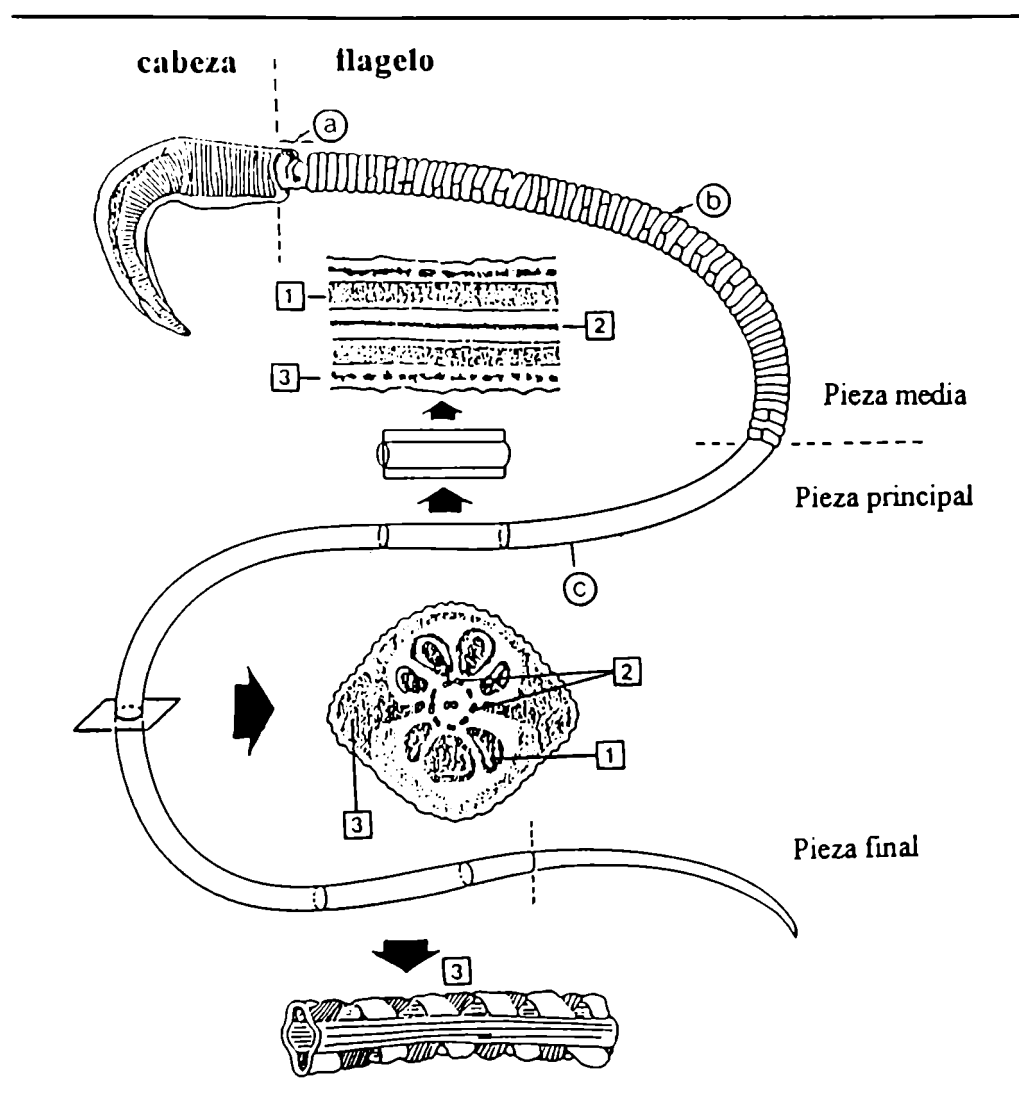
El flagelo de los espermatozoides de mamíferos está compuesto por cuatro segmentos: la pieza conectora (cuello), la pieza media, la pieza principal y la pieza final. Las principales estructuras que se encuentran en el flagelo son el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la vaina fibrosa (*Figura 1.3*).

El axonema se extiende a lo largo de todo el flagelo y está compuesto por un complejo de microtúbulos del tipo "9+2", el cual está altamente ordenado y rodeado por densas fibras que se extienden desde la cabeza hasta el final posterior del axonema. La porción anterior o pieza media del flagelo contiene mitocondrias envueltas en una hélice compacta (vaina mitocondrial); mientras que la porción posterior o pieza principal posee una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas. Las fibras densas y la vaina fibrosa conforman el citoesqueleto del flagelo.

El flagelo provee la energía de movimiento necesaria para la fertilización. Los diferentes elementos que constituyen el flagelo generan ondas desde la base del flagelo hasta su punta y proveen la fuerza de propulsión (Eddy, 1988).

#### **1.2. Maduración epididimaria**

El epidídimo de muchas especies, incluyendo la humana, no es un mero conducto por donde circulan los espermatozoides en su pasaje desde el testículo hacia las vesículas seminales. Por el contrario, existe una estrecha interrelación entre la gameta masculina y el epidídimo. Al abandonar el testículo, los espermatozoides de mamíferos (a diferencia de los invertebrados y de los anuros), no poseen la capacidad de fertilizar al ovocito. Esta capacidad la adquieren por el lento pasaje a través del epidídimo, denominándose a este proceso *maduración epididimaria*.



**Figura I.3: Características generales del espermatozoide de mamíferos.** La cabeza del espermatozoide está unida a la pieza conectora (a) del flagelo. Las otras regiones del flagelo son la pieza media, la pieza principal y la pieza final. La pieza media contiene la vaina mitocondrial (b), mientras que la pieza principal contiene la vaina fibrosa (c). Las flechas muestran un corte longitudinal y uno transversal de la pieza principal. **1** fibras densas, **2** axonema, **3** vaina fibrosa. Tanto el axonema como las fibras densas se disponen todo a lo largo del flagelo.

El lugar donde los espermatozoides completan su maduración varía según la especie. En el carnero la maduración se completa en el segmento distal del caput (cabeza) mientras que en la rata, esto ocurre en el segmento distal del corpus (cuerpo) (Dacheux y Paquignon, 1980). Sin embargo, en la mayoría de las especies la maduración se completa en el segmento distal del epidídimo caudal (cola). En aquellas especies donde los espermatozoides se almacenan en el conducto deferente antes de ser eyaculados, la maduración puede continuar en este conducto. En el hamster, tanto los espermatozoides de epidídimo caudal como los provenientes del conducto deferente fertilizan el 100% de los ovocitos. Sin embargo, todos los ovocitos fertilizados por espermatozoides del epidídimo caudal son monospermicos, mientras que los fertilizados con espermatozoides del conducto deferente son polispermicos (Yanagimachi *y col.* 1985). Esto indicaría que los espermatozoides del conducto deferente son más competentes para la fertilización que los espermatozoides del epidídimo caudal, ya que un mayor número de éstos penetra al ovocito dentro del lapso de tiempo anterior al bloqueo polispermico. Por ende, los espermatozoides de hamster probablemente continúen la maduración en el conducto deferente.

Uno de los cambios más importantes que sufren los espermatozoides en el proceso de maduración es la adquisición de la motilidad. En el epidídimo caudal, los espermatozoides presentan un movimiento activo y progresivo mientras que en el testículo carecen de motilidad. Esta falta de motilidad por parte de los espermatozoides testiculares se debería en parte, a la inmadurez de la membrana plasmática, porque espermatozoides testiculares carentes de esta membrana y expuestos a ATP, AMP cíclico (AMPC) y  $Mg^{++}$  presentan una activa motilidad, semejante a la de espermatozoides maduros del epidídimo caudal (Ishijima *y col.* 1985). Se cree, también que la transferencia de ciertas sustancias como la carnitina (Acott *y col.* 1983) y la glicerofosfocolina (Infante y Huszagh, 1985) del fluido epididimario al espermatozoide es importante para la adquisición de la motilidad.

El epidídimo presenta una gran actividad secretora y de absorción. La osmolaridad y la composición química del fluido secretado por el epidídimo varía de un segmento a otro (Lechene, 1982). En el epidídimo se crea un microambiente adecuado y característico para el espermatozoide y a su vez el espermatozoide regula este microambiente estimulando la actividad secretora del epitelio epididimario (Leung y Wong, 1994). Un claro ejemplo de esta estrecha relación es el caso de la liberación de la angiotensina I por parte de las células epiteliales del

epidídimo: el espermatozoide posee la enzima que convierte la angiotensina I en angiotensina II. Este último metabolito actúa sobre el epitelio epididimario estimulando la secreción de electrolitos en el lumen del epidídimo (Wong y Uchendu, 1990). Es esperable, entonces, que la totalidad de la membrana plasmática del espermatozoide, que está directamente expuesta al fluido epididimario, se altere diferencialmente en las distintas regiones del epidídimo (Olson y Orgebin-Crist, 1982). Una clara evidencia de estos cambios, es la capacidad que adquiere la membrana del espermatozoide de adherirse a la zona pelúcida del ovocito (Cuasnicú y col. 1984a; Orgebin-Crist y Fournier-Delpech, 1982) o el cambio neto de carga negativa en la membrana plasmática durante la maduración (Moore, 1979).

Cuando los espermatozoides salen del testículo, la membrana plasmática está cubierta con varias macromoléculas (antígenos) que durante el pasaje por el epidídimo se pierden ó alteran. Existen también glicoproteínas que se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide (Peterson y Russell, 1985; Young y col. 1985). Este mecanismo parece estar mediado, en parte, por enzimas (galactosiltransferasa, sialitransferasa) (Hamilton y Gould, 1980; Bernal y col. 1980) presentes en el fluido epididimario.

Las glicoproteínas no son las únicas moléculas de membrana que varían durante la maduración. Los lípidos de membrana también sufren cambios químicos y físicos (Parks y Hammerstedt, 1985). En el corpus epididimario hay una elevada síntesis de colesterol, lo cual sugiere que el colesterol se integra a la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración espermática.

### 1.3. Capacitación espermática

Los espermatozoides que maduraron en el epidídimo se mueven activamente pero no poseen la *inmediata* capacidad de fertilizar al ovocito. Es decir, los espermatozoides han adquirido potencialmente la capacidad fertilizante pero todavía no la pueden "mostrar"; necesitan pasar primero por el tracto genital femenino para poder expresarla. Se define al proceso de *capacitación* como los cambios fisiológicos (funcionales) que llevan al espermatozoide a ser competente para fertilizar al ovocito.

Se postula que este proceso, característico del espermatozoide de los mamíferos, ocurre cuando ciertas moléculas, que estabilizan a la membrana plasmática del espermatozoide son eliminadas o alteradas favoreciendo así los ulteriores procesos de hiperactivación y reacción

acrosomal (Bedford, 1967).

### **1.3.1. Capacitación *in vivo***

La necesidad de un periodo de capacitación previo a la fertilización fue observada primeramente por Chang (1951) y Austin (1952); sin embargo, aún hoy no se conocen con exactitud las bases moleculares de la misma.

Se sabe que el lugar donde los espermatozoides comienzan la capacitación varía según el sitio de deposición de los mismos. En algunas especies como el perro, el cerdo y varios roedores, el semen es depositado en el útero; mientras que en la mayoría de los mamíferos euterios, el semen es depositado en la vagina siendo el cérvix el sitio donde la gameta masculina comienza a capacitarse.

En la mayoría de las especies, la capacitación finaliza en el istmo. Esta región del oviducto es el sitio donde los espermatozoides se almacenan hasta el momento de la ovulación; es una zona rica en receptores adrenérgicos (Jasen, 1978) y posee irrigación directa desde el ovario, sugiriendo una alta sensibilidad a pequeñas variaciones hormonales (Hunter y *col.* 1983). Esto explicaría la sincronía entre el ascenso de los espermatozoides y el descenso de los ovocitos a la ampolla o ampulla (Overstreet y Cooper, 1979a; Smith y Yanagimachi, 1991).

Los espermatozoides pueden capacitarse en el oviducto ó el útero aislado (Bedford, 1969; Brackett y Server, 1970). Sin embargo, se ha demostrado que los espermatozoides se capacitan con mayor eficiencia cuando pasan secuencialmente primero por el útero y luego por el oviducto. Algunos autores también demostraron que los espermatozoides pueden capacitarse aún fuera del tracto genital femenino, en la cavidad peritoneal (Verkuyl, 1988). Por lo tanto, uno podría pensar que lo especial y único del tracto genital femenino respecto a la capacitación es la habilidad que éste posee para controlar la velocidad de capacitación y para sincronizar el encuentro efectivo entre las dos gametas.

### **1.3.2. Eventos que ocurren durante la capacitación**

#### **1.3.2.1. Remoción del plasma seminal**

Ciertos componentes que provienen de las glándulas anexas (vesícula seminal, próstata, glándulas de Cowper y de Littre) se adhieren a la membrana plasmática del espermatozoide previniendo la expresión de la capacidad fertilizante del mismo. Algunos ejemplos son:



- el zinc ( $Zn^{++}$ ) que inhibe a la  $PLA_2$
- la caltrina que inhibe la entrada de  $Ca^{++}$  al espermatozoide (Coronel y Lardy, 1992).
- una proteína de la vesícula seminal que inhibe la actividad de la acrosina (Boettger-Tong y col. 1992).

La remoción del plasma seminal por centrifugación ó por migración espontánea (swim-up) es indispensable para que ocurra la capacitación *in vitro*. Si espermatozoides ya capacitados son resuspendidos en plasma seminal, éstos se decapacitan; siendo entonces la capacitación un evento reversible.

### 1.3.2.2. Cambios en la membrana plasmática

#### *I. Alteración de proteínas*

- Las proteínas unidas a la membrana plasmática de manera no covalente se liberan durante el pasaje por el útero; mientras que otras se adsorben a la membrana (Volgmayr y Sawyer, 1986).
- Algunas proteínas estructurales o epididimarias pierden residuos de azúcares disminuyendo su peso molecular (Singer y col. 1985). Un ejemplo de ello es la proteína de 100 kD de espermatozoide de carnero, la cual disminuye a 91 kD luego del proceso de capacitación (Villarroya y Scholler, 1987).
- Otras proteínas migran distancias cortas o en áreas pequeñas formando parches con y sin partículas (Villarroya y Scholler, 1987; Suzuki y Yanagimachi, 1989; Rochwerger y Cuasnicú, 1992). La fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa tendría origen en zonas libres de partículas.

#### *II. Alteración de lípidos*

- Se liberan de la membrana plasmática esteroides libres y conjugados (colesterol y desmoesteroides sulfatados), otorgándole una mayor fluidez a la misma (Ehrenwald y col. 1988).
- La fijación de  $Ca^{++}$  en la fosfatidilserina inhibe la acción estabilizadora de este fosfolípido sobre la fosfatidil- etanolamina.
- La metilación de fosfatidiletanolamina aumenta el contenido de fosfatidilcolina, la cual favorece la formación de lisofosfatidilcolina (Stojanoff y col. 1988).

Estos cambios en la relación colesterol:fosfolípidos contribuyen a la desestabilización de las membranas, perdiendo la rigidez adquirida durante la maduración epididimaria. La mayor fluidez de las membranas favorece los procesos de reacción acrosomal y fusión de gametas.

#### 1.3.2.3. Cambios metabólicos

Se conoce poco sobre los cambios metabólicos que ocurren durante la capacitación. Boell (1985) describe un aumento de la actividad respiratoria durante este proceso pero lo atribuye a la presencia de sustratos energéticos en el medio capacitante y no al proceso de capacitación en sí mismo. Se observó, también un aumento del pH intracelular, que refleja un intercambio de iones: Hyne *y col.* (1985) describen una reducción intracelular de  $K^+$  y un aumento importante de  $Na^+$ . Con respecto al  $Ca^{++}$ , los resultados son contradictorios. Algunos autores postulan un aumento durante la capacitación (Fraser y McDermott, 1992) mientras que otros demuestran lo contrario (Ruknudin y Silver, 1990).

#### 1.3.2.4. Cambios en la motilidad del espermatozoide

Durante la capacitación los espermatozoides adquieren primeramente una motilidad progresiva y lineal. Como *consecuencia* de la capacitación, los espermatozoides adquieren un patrón de motilidad característico denominado *hiperactivación* (Fraser, 1977). Los espermatozoides hiperactivados se mueven vigorosamente, batiendo la cola en forma de látigo y generalmente con la cabeza describiendo un ocho.

La hiperactivación de los espermatozoides en el tracto genital femenino comenzaría en la ampolla. Se postula que la hiperactivación sirve al espermatozoide para despegarse del epitelio del istmo oviductal (que funciona como reservorio) y le permite avanzar dentro del fluido viscoso del oviducto hacia el ovocito (Deutch *y col.* 1985). Otra función sería la de facilitar la entrada del espermatozoide por las distintas cubiertas del ovocito (hipótesis mecánica).

Las bases bioquímicas de la hiperactivación no se conocen con exactitud. Se ha comprobado que la presencia de  $Ca^{++}$  (Yanagimachi, 1982) y de glucosa (Cooper, 1984) es indispensable para que se genere la hiperactivación. El aumento de  $Ca^{++}$  intracelular, posiblemente vía proteína G, que a su vez activa canales de  $Ca^{++}$ , estimula a la adenilato ciclasa. El aumento de AMPc activa a proteínas quinasas, las cuales fosforilan proteínas relacionadas con el deslizamiento del axonema (dineína) (Yanagimachi, 1994). Según Tash y Bracho (1994),

cada vez existe mayor evidencia sobre el importante rol que cumplen las proteínas fosfatasa en la motilidad; aunque asumen que todos los cambios de motilidad no pueden regularse sólo por fosforilaciones.

### 1.3.3. Capacitación *in vitro*

La capacitación se puede lograr también *in vitro*, es decir fuera del tracto genital femenino. Los requerimientos para obtener espermatozoides capacitados *in vitro* son los siguientes:

- utilizar una suspensión de espermatozoides libre de plasma seminal (Shalgi y col. 1981). Esto se obtiene por la técnica de swim-up ó por centrifugación. Otra posibilidad es trabajar con espermatozoides epididimarios como en el caso de ratón, rata o hamster.
- utilizar un medio de incubación, que puede ser una solución Krebs-Ringer modificada o Tyrode suplementada con sustratos metabólicos adecuados (lactato, piruvato y glucosa).
- suplementar el medio de incubación con aceptores de colesterol como el suero y la albúmina (BSA). El suero es más eficiente que el BSA porque posee proteínas tales como las HDL, LDL y VLDL. Se piensa que la albúmina favorece la desestabilización de la membrana plasmática mediante la remoción del colesterol (Ravnik y col. 1993). Cabe aclarar que algunos autores demuestran que la albúmina no es requisito indispensable para que ocurra la capacitación espermática pero sí la reacción acrosomal (Fraser, 1985).
- en el caso de espermatozoides bovinos es necesaria la presencia de heparina, que aumenta el influjo de  $Ca^{++}$  (Uguz y col. 1994).

El tiempo que requiere la capacitación *in vitro* varía según la especie. En el ratón es de aproximadamente 90-120 minutos (min) mientras que en el humano es de 3-5 horas (hs).

### 1.4. Penetración espermática a través del cúmulus

Los ovocitos de mamíferos poseen dos importantes barreras (las células del cúmulus y la zona pelúcida), que el espermatozoide debe atravesar antes de fusionarse con el oolema. Los ovocitos de algunos mamíferos como los ungulados, monotremos y marsupiales pierden el cúmulus antes de la ovulación (Rodger y Bedford, 1982). En estos casos sólo la zona pelúcida recubre al ovocito.

El cúmulus está compuesto por células de la granulosa y células tecales y por una matriz

de ácido hialurónico (2500 kD) asociado a proteínas (Virji y col. 1990). Las células del cúmulus sintetizan esta matriz (Tesarik y col. 1988) además de secretar progesterona y prostaglandinas (Schuetz y Dubin, 1981).

Varias son las funciones que se atribuyen al cúmulus, como ser:

- reducir el proceso de endurecimiento o "hardening" de la zona pelúcida luego de la ovulación.
- seleccionar los espermatozoides más aptos para la fertilización.
- favorecer el anclaje y la fusión del espermatozoide con el oolema (Yudin y col. 1988).

No todos los espermatozoides logran atravesar el cúmulus. Sólo aquellos que están capacitados (Austin, 1960) pero todavía no reaccionados, pueden hacerlo. Es decir, los espermatozoides no capacitados o los que sufrieron la reacción acrosomal antes de pasar el cúmulus son incapaces de penetrarlo (Cummins y Yanagimachi, 1986).

Varios trabajos se han realizado para conocer si el pasaje del espermatozoide a través del cúmulus es meramente mecánico o si también depende de la acción enzimática. Talbot y col. (1985) consideran que la hialuronidasa asociada a membrana plasmática (y no la de origen acrosomal) facilita este proceso. Sin embargo, aunque los espermatozoides de sapo y erizo de mar no poseen esta enzima son igualmente capaces de atravesar el cúmulus y de llegar intactos a la zona pelúcida (Talbot y col. 1985). Por lo tanto, hasta el momento, los datos experimentales *in vitro* nos demuestran que tanto la motilidad como la acción enzimática intervienen en el pasaje a través del cúmulus.

### **1.5. Interacción espermatozoide-zona pelúcida**

La zona pelúcida es una matriz acelular glicoproteica secretada por el ovocito durante su crecimiento (Bleil y Wassarman, 1980). Al pasar al oviducto se le incorporan glicoproteínas sintetizadas por células epiteliales del istmo y de la ampolla (Abe y Oikawa, 1991). En varias especies se identificaron diferentes familias de glicoproteínas de la zona pelúcida, las cuales presentan cierto grado de homología (Chamberlin y Dean, 1990). En el ratón, la zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas: ZP<sub>1</sub> (200 kD), ZP<sub>2</sub> (120 kD) y ZP<sub>3</sub> (83 kD). La ZP<sub>1</sub> es un polipéptido con cadenas cortas de oligosacáridos, las ZP<sub>2</sub> y ZP<sub>3</sub> se combinan para formar filamentos, los cuales se unen mediante la ZP<sub>1</sub>, originando una estructura tridimensional (Wassarman, 1991). Algunas funciones que se le asignan a la zona pelúcida son:

- evitar la polispermia.
- inducir la reacción acrosomal en algunas especies (ratón).
- proteger al ovocito y al embrión de daños físicos (Nichols y Gardner, 1989).
- crear un microambiente óptimo para el desarrollo del embrión.
- es esencial para el desarrollo *in vivo* del embrión preimplantacional.

### **1.5.1. Unión zona pelúcida-espermatozoide**

Los espermatozoides capacitados se unen firmemente a la zona pelúcida de los ovocitos maduros. Esta unión está mediada por componentes de la zona pelúcida y por moléculas presentes en la superficie del espermatozoide.

#### **1.5.1.1. Receptores en la zona pelúcida**

Gwatkin y Williams (1977) encontraron que al incubar previamente espermatozoides capacitados de hamster con zona pelúcida solubilizada, la unión a la superficie de zona pelúcida intacta estaba inhibida. Sin duda, la superficie del espermatozoide tiene moléculas con alta afinidad a la zona pelúcida y esos sitios son saturables.

Los componentes responsables de esta unión se conocen claramente en el ratón y recientemente se han descrito en humanos (Moos *y col.* 1995).

Según Mortillo y Wassarman (1991) hay dos componentes en la zona pelúcida responsables de la unión: la molécula  $ZP_3$ , que se une a la membrana plasmática del espermatozoide sobre el capuchón acrosomal y la  $ZP_2$ , que se une preferentemente a la membrana acrosomal interna. Es decir, que la  $ZP_3$  se une al espermatozoide intacto (sin reaccionar), mientras que la  $ZP_2$  se une en segundo término cuando el espermatozoide está reaccionado. La capacidad de unión de la  $ZP_3$  está dada por los residuos de azúcares que posee (Rosiere y Wassarman, 1992). Además de esta función, la  $ZP_3$  es capaz de inducir la reacción acrosomal, esta función está asociada a su estructura peptídica (Crozet, 1993).

Entonces, la  $ZP_3$  se caracteriza por:

- ser el primer ligando zona pelúcida-espermatozoide.
- unirse al espermatozoide intacto.
- poseer la capacidad de unión (residuos de azúcares) al espermatozoide y de disparar la reacción acrosomal (estructura proteica).

### 1.5.1.2. Receptores en el espermatozoide

Muchas proteínas se han propuesto como receptores en el espermatozoide de la ZP<sub>3</sub>. Kopf y Gerton (1991) postulan que el receptor de la molécula ZP<sub>3</sub> es una proteína con dos sitios de unión, uno con actividad de ligando y el otro con la capacidad de desencadenar la reacción acrosomal. Duncan y Fraser (1993) y Leyton y Saling (1989) demuestran que una proteína de 95 kD con actividad tirosina kinasa podría cumplir esa función.

Por otro lado, otros autores sugieren a una galactosil-transferasa como receptor. Cuando se incuban los espermatozoides con alfa-lactoalbúmina, la cual se une específicamente a la galactosiltransferasa, la unión zona pelúcida-espermatozoide es inhibida de manera concentración-dependiente (Shur y Hall, 1982). Estos ensayos sugieren que la galactosiltransferasa en la superficie del espermatozoide participa en la interacción de gametas uniéndose a residuos N-acetilglucosaminos de la ZP<sub>3</sub>.

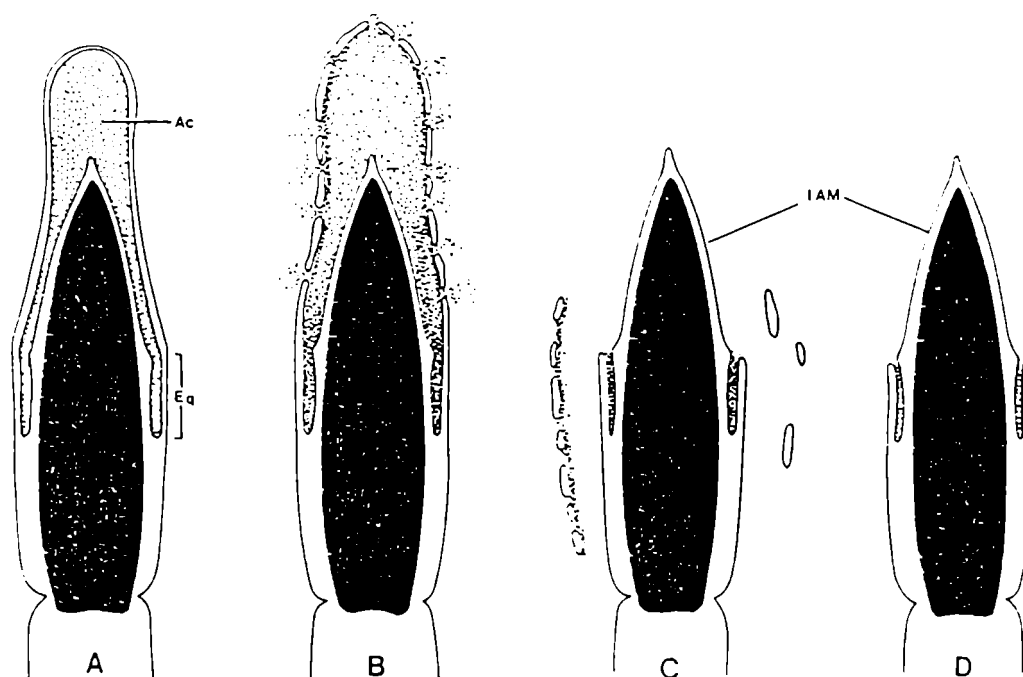
En cuanto al receptor para ZP<sub>2</sub>, el candidato más fuerte es una enzima acrosomal denominada acrosina (Bleil y col. 1988). Barros y col. (1992) localizaron a la acrosina en la membrana acrosomal interna de espermatozoides de hamster, otorgando así más fuerza a esta teoría.

### 1.5.2. La reacción acrosomal

El acrosoma de los espermatozoides de mamíferos es una organela rodeada por membranas y recubre la porción anterior del núcleo del espermatozoide. Es producto del complejo de Golgi y es sintetizada y ensamblada durante la espermiogénesis.

La *reacción acrosomal* (RA) es un evento exocitótico característico de la gameta masculina. Involucra múltiples fusiones entre la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa dando origen a vesículas híbridas (Barros y col. 1967). Como resultado de esta reacción, el contenido acrosomal es liberado y la membrana acrosomal interna queda expuesta a fin de interaccionar con la zona pelúcida (*Figura I.4*). El segmento ecuatorial del acrosoma no se vesiculiza, tal vez por la presencia de calpactina II y vimentina que conectan firmemente la membrana plasmática con la acrosomal externa (Berruti, 1991).

El significado fisiológico de la reacción acrosomal parece ser facilitar al espermatozoide



**Figura I.4: Diagrama que ilustra la secuencia temporal de la reacción acrosomal. (A) Antes de que ocurra la reacción acrosomal. (B) Reacción acrosomal: las fusiones múltiples entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa permiten la liberación del contenido acrosomal (enzimas). (C) La reacción acrosomal se ha completado: la membrana acrosomal interna queda expuesta. Ac.: capuchón acrosomal, Eq.: segmento ecuatorial, IAM.: membrana acrosomal interna.**

el pasaje a través de las distintas cubiertas del ovocito para fusionarse finalmente, con el oolema (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, muchos autores no consideran a la reacción acrosomal sólo como una simple exocitosis de enzimas hidrolíticas, sino que la asocian también con cambios a nivel de la membrana del espermatozoide que favorecen la fusión con el oolema. Tal es el caso de la proteína PH-20 presente en la región acrosomal de la membrana plasmática, la cual migra a la región posterior de la cabeza como consecuencia de la reacción acrosomal (Myles, 1993). Entonces, se puede afirmar que la finalización de la reacción acrosomal es un requisito absoluto para que ocurra la fertilización.

*In vivo*, gran número de espermatozoides mueren en el tracto genital femenino y pierden el acrosoma. Sólo aquellos que se encuentran en el lugar correcto y en el momento adecuado sobreviven al medio hostil del tracto. Los espermatozoides que llegan al útero y al oviducto mantienen sus acrosomas intactos (Overstreet y Cooper, 1979b). En el momento de la fertilización, algunos espermatozoides sufren reacción acrosomal en el cúmulus para facilitar la entrada de otros espermatozoides no reaccionados (Cummins y Yanagimachi, 1986), los cuales están aptos para interaccionar con la zona pelúcida y fertilizar al ovocito. Como hecho general, los espermatozoides con el acrosoma intacto pueden unirse a la zona pelúcida. Sin embargo, en cobayo y en conejo se comprobó que el espermatozoide reaccionado también es capaz de unirse a la zona pelúcida.

#### 1.5.2.1. Clasificación

- *Reacción acrosomal verdadera vs. falsa*: cuando los espermatozoides mueren, las membranas pierden semipermeabilidad y el acrosoma se autodigiere. Al microscopio óptico, estos espermatozoides se ven como reaccionados. Por lo tanto, se debe distinguir entre las modificaciones degenerativas del acrosoma de espermatozoides muertos y la reacción acrosomal fisiológica que ocurre en espermatozoides móviles. Se propuso denominar reacción acrosomal falsa a la del primer caso y verdadera a la del segundo (Bedford, 1970).

Las técnicas experimentales que se utilicen para determinar la reacción acrosomal deben distinguir entre ambos tipos de reacción. El mejor método es la microscopía electrónica. Esta técnica es la única capaz de distinguir modificaciones menores del acrosoma. Sin embargo, debido a su costo y complejidad, usualmente se utilizan tinciones dobles, las cuales determinan simultáneamente la viabilidad y el status acrosomal de los espermatozoides. En los casos en que



el acrosoma es grande y visible (cobayo) se utiliza el microscopio de contraste de fase.

- *Reacción acrosomal espontánea vs. inducida*: se encuentra bien establecido que espermatozoides de diferentes especies pueden sufrir una reacción acrosomal verdadera en ausencia de inductores. A este tipo de reacción acrosomal se la denomina espontánea. La llamada reacción acrosomal inducida es la que se produce en los espermatozoides vivos en presencia de inductores. Algunos inductores fisiológicos descritos en la literatura son: la zona pelúcida, el fluido folicular, la progesterona, el diacilglicerol (DAG) (Mate y Rodger, 1993) y el factor natriurético atrial (ANP) (Anderson y col. 1994). También existen inductores no fisiológicos como el ionóforo de  $\text{Ca}^{++}$  (A-23187), el medio hiperosmótico y el etanol (Tarín y Trounson, 1994).

#### **1.5.2.2. Reacción acrosomal inducida por progesterona**

La progesterona, producida por el cúmulus inicia la reacción acrosomal en espermatozoides de distintas especies: humano, hamster, cobayo, cerdo, y ratón (Roldán y col. 1994).

La reacción acrosomal tiene características similares a la exocitosis producida por células somáticas. Esta es regulada a través de receptores por señales de transducción específicas que incluyen cambios en la conductancia iónica, en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos y de los fosfoinosítidos. Es razonable pensar entonces, que los procesos de transducción que ocurren en el espermatozoide y desencadenan la reacción acrosomal, son regulados por receptores específicos.

El receptor de progesterona se localiza exclusivamente en la cabeza del espermatozoide (Meizel y Turner, 1991) y difiere fundamentalmente del receptor intracelular de progesterona ya que no actúa a nivel genómico y genera una respuesta en pocos minutos (15 min). La progesterona despolariza la membrana plasmática del espermatozoide (Foresta y col. 1993) y produce un aumento intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  libre, el cual proviene del medio extracelular (Blackmore y Lattanzio, 1991). El influjo de  $\text{Ca}^{++}$  conduce a la activación de proteínas tirosinas quinasas y a la fosforilación de la proteína p95 (Tesarik y col. 1993). Además, la progesterona activa a la  $\text{PLA}_2$  y estimula la síntesis de alquil-acetil-glicerofosfolina (factor activador de plaquetas: PAF) (Baldi y col. 1993). Sin embargo, los mecanismos que regulan estos procesos

y su relación con la exocitosis aún no se conocen.

### 1.5.2.3. Mecanismos involucrados en la reacción acrosomal

- *Hipótesis mecánica*: esta hipótesis establece que la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida es puramente mecánica. Las enzimas acrosomales no cumplen función alguna; la intensa motilidad del espermatozoide (hiperactivación) es el único requerimiento.

Algunas observaciones a favor de esta hipótesis son:

- la detección de un fino corte con bordes bien definidos sobre la zona pelúcida cuando el espermatozoide la atraviesa (Jedlicki y Barros, 1985).

- los inhibidores de proteasas bloquean la unión del espermatozoide a la zona, pero una vez unido, la penetración no puede ser inhibida (Saling, 1981).

- un trabajo reciente de Wakayama *y col.* (1996) demuestra por microscopía electrónica la capacidad de espermatozoides de un roedor australiano ("vole") para atravesar la zona pelúcida sin que ocurra la reacción acrosomal.

- *Hipótesis enzimática*: esta hipótesis postula que las enzimas del acrosoma son las responsables de la unión y de la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida. En este caso, la motilidad del espermatozoide tiene importancia secundaria.

Algunos autores postulan a la acrosina como la enzima responsable de este proceso. Esta enzima se puede encontrar como proacrosina (53 kD), alfa acrosina o beta acrosina (38 kD). La proacrosina tiene la capacidad de unirse fuertemente a la zona pelúcida (Urch y Patel, 1991), mientras que la alfa acrosina hidroliza glicoproteínas específicas de la zona, modificando su consistencia. La conversión de pro a alfa acrosina sería autocatalítica y gatillada por las glicoproteínas presentes en la zona pelúcida. La autólisis de alfa acrosina resulta en beta acrosina, la cual tiene capacidad de hidrolizar la zona pelúcida pero no puede unirse a ella (Urch *y col.* 1985). La validez de esta hipótesis depende de la concentración de acrosina presente en la gameta masculina, el tiempo de autólisis de la acrosina y su localización en la membrana plasmática y membrana acrosomal interna.

### 1.6. Fusión ovocito-espermatozoide

Luego de penetrar la zona pelúcida, el espermatozoide reaccionado atraviesa rápidamente

el espacio perivitelino (espacio estrecho entre la zona pelúcida y el oolema), se fusiona con el oolema y como consecuencia de la fusión, pierde su motilidad (Longo *y col.* 1986).

El proceso de fusión es menos especie-específico que el de la unión a la zona pelúcida y depende de la temperatura, del pH del medio y del status acrosomal del espermatozoide.

Los ensayos de inhibición con anticuerpos establecen que en la superficie del espermatozoide existen moléculas que intervienen en el proceso de fusión. Algunos ejemplos son: la proteína PH-30 de hamster (Primakoff *y col.* 1987) y la proteína DE en rata (Cuasnicú *y col.* 1984b; Rochwerger *y col.* 1992). Asimismo, se sugiere que tanto en el ovocito como en el espermatozoide habría integrinas involucradas en el proceso de fusión (Klentzeris *y col.* 1995).

Mediante microscopía electrónica se observó que en mamíferos euterios existe una región de fusión específica del espermatozoide que es el segmento ecuatorial; mientras que en los marsupiales es la membrana acrosomal interna. El segmento ecuatorial adquiere la capacidad fusogénica al producirse la reacción acrosomal. Durante la fusión, la región posterior de la cabeza y la cola son incorporadas por el ovocito vía fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es fagocitada.

Así como existe una región específica de fusión en el espermatozoide (segmento ecuatorial), también existe en el ovocito. El oolema presenta por lo menos dos regiones bien diferenciadas: (1) una región libre de gránulos corticales por donde extruye el segundo corpúsculo polar y (2) el resto de la membrana que a diferencia de la región anterior se encuentra recubierta de microvellosidades. Rara vez el espermatozoide se fusiona con el oolema en la región libre de gránulos corticales. Sin embargo, todavía no se han determinado las bases moleculares involucradas en la exclusión de esta zona durante la fusión con el espermatozoide.

### **1.7. Activación del ovocito**

La fusión con el espermatozoide dispara la activación del ovocito, que implica una serie de eventos bioquímicos y morfológicos. Algunos de ellos serán detallados a continuación.

#### **1.7.1. Cambio en el potencial de membrana y movilización de $\text{Ca}^{++}$**

Cerca del sitio de unión del espermatozoide se generan en pocos segundos sucesivas

ondas de  $\text{Ca}^{++}$ . El aumento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular resulta de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  de los depósitos intracelulares. Como consecuencia de esto, la permeabilidad al ión  $\text{K}^+$  aumenta, hiperpolarizando gradualmente la membrana del ovocito desde -20 mV hasta -40 mV (Miyazaki, 1988).

El espermatozoide no sólo desencadena la activación sino que interviene en el mecanismo de movilización de  $\text{Ca}^{++}$ . Según algunos autores un ligando putativo del espermatozoide se uniría al oolema activando a la PLC vía proteína G o vía tirosina quinasa. Swann (1990) propone a un factor citosólico del espermatozoide como responsable de la activación de la PLC.

Por otro lado, la activación del ovocito se puede lograr artificialmente (sin el espermatozoide) mediante un influjo periódico de  $\text{Ca}^{++}$  o por la inyección de 1-4-5-inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) (Cran y col. 1988).

### 1.7.2. Reacción cortical

En respuesta a la movilización de  $\text{Ca}^{++}$  se produce la exocitosis de los gránulos corticales, llamada *reacción cortical*. Estos gránulos están adyacentes al oolema y contienen mucopolisacáridos, ácido fosfatídico, enzimas hidrolíticas y peroxidasa, que son liberados al espacio perivitelino en la reacción cortical. Estos compuestos modifican las características químicas y físicas de la zona pelúcida. Moller y Wassarman (1989), encontraron en el ratón una proteasa de gránulos corticales que hidroliza parcialmente a la glicoproteína  $\text{ZP}_2$  promoviendo el endurecimiento o "hardening" de la zona pelúcida. La zona, así modificada, impide la entrada de los espermatozoides generando el bloqueo polispérmico.

Sin embargo, el bloqueo no está acotado a la zona pelúcida (reacción de zona); el oolema también contribuye a evitar la polispermia. A diferencia del erizo de mar, en el ratón no ocurriría un bloqueo polispérmico por despolarización del oolema (Jaffe y col. 1983), sino que la membrana cambiaría sus propiedades por un mecanismo independiente de la reacción cortical. De acuerdo con Sato (1979), el bloqueo polispérmico del oolema murino se da un minuto después de la fusión. La liberación de los gránulos corticales y por ende el bloqueo de zona ocurre varios minutos después.

### 1.7.3. Desarresto de la meiosis

En todas las células eucariotas, el ciclo celular está regulado por dos proteínas: la cdc2

quinasa (34 kD) y la ciclina (50 kD). La cdc2 está siempre presente mientras que la ciclina varía su concentración a lo largo del ciclo. En la fase G1 la ciclina se sintetiza y se une a la cdc2 para formar el factor promotor de la metafase (MPF) que está inactivo (residuo 15 de tirosina fosforilado y residuo 161 de treonina desfosforilado). Luego, el MPF se activa variando sus fosforilaciones y dispara la ruptura de la envoltura nuclear para que la célula avance a la fase M. El factor citostático (CSF) estaría estabilizando de alguna manera al MPF.

Durante el proceso de activación del ovocito, la gameta femenina reanuda la meiosis arrestada en metafase II. El aumento de  $\text{Ca}^{++}$  y la acción de la PLC que rompe el balance de proteínas fosforiladas/desfosforiladas modulando los canales iónicos de membrana, inactivan al MPF y al CSF (Newport, 1984; Whitaker y Patel, 1990). Esta inactivación junto a un aumento del pH interno permite al ovocito completar la meiosis originando dos células con la mitad del ADN materno pero de tamaño desigual: el óvulo y el segundo corpúsculo polar. Esta asimetría mantiene en el óvulo una proporción mayor de vitelo, que es indispensable para el posterior desarrollo del embrión.

### **1.8. Descondensación nuclear del espermatozoide en el ooplasma**

Durante la transformación de espermátide a espermatozoide, las histonas nucleares son reemplazadas por protaminas. En el proceso de maduración espermática ocurre una extensa conversión de protaminas reducidas a oxidadas ( $\text{SH} - \text{S-S}$ ) otorgando rigidez al núcleo (Meistrich y Reid, 1976) y favoreciendo así el pasaje del espermatozoide por las distintas cubiertas del ovocito.

Cuando el núcleo espermático es incorporado al ovocito sufre una serie de transformaciones como la desintegración de la envoltura nuclear, la descondensación de la cromatina, la reducción de puentes disulfuro de protaminas asociadas al ADN y el cambio de protaminas por histonas.

La desintegración de la envoltura nuclear ocurre durante el estadio de metafase II del ovocito. La ruptura comienza a nivel del segmento ecuatorial y continúa anterior y posteriormente. De acuerdo con Berrios y Bedford (1976), los espermatozoides murinos fusionados con ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal son incapaces de romper la envoltura nuclear; infiriendo, entonces que el ooplasma de ovocitos maduros interviene en el proceso de desintegración nuclear.

La descondensación de la cromatina tiene lugar durante la activación del ovocito, en el pasaje de metafase II a telofase II. Sin embargo, la activación no es un proceso indispensable para la descondensación. Por ejemplo, cuando los espermatozoides son microinyectados en ovocitos maduros, los ovocitos permanecen inactivados pero los espermatozoides son capaces de descondensarse (Uehara y Yanagimachi, 1977).

En el ooplasma, las protaminas espermáticas oxidadas (S-S) son reducidas (SH) por agentes reductores como el glutatión (Perreault *y col.* 1988). Las protaminas se despegan del ADN por su alta afinidad a nucleoplasminas del ooplasma. El ADN, ahora libre, se une a las histonas.

### **1.9. Formación de pronúcleos y singamia**

Luego de la protrusión del segundo corpúsculo polar, comienza la recondensación de la cromatina espermática. El estadio de mayor condensación de la cromatina masculina corresponde a la formación de los pronúcleos (Adenot *y col.* 1991).

El desarrollo del pronúcleo masculino está bajo el control de factores citoplasmáticos. A diferencia de la descondensación nuclear masculina, la formación del pronúcleo masculino requiere la activación ovocitaria y por ende la inactivación del MPF. Otra molécula involucrada en este proceso es el factor de crecimiento del pronúcleo masculino, el cual se produce en el ooplasma sólo en presencia de las células de la granulosa.

La síntesis de ADN comienza simultáneamente en los dos pronúcleos. En el ratón la síntesis ocurre 10-11 hs luego de la penetración del espermatozoide y dura de 6-7 hs (Howlett y Bolton, 1985). Finalmente, los pronúcleos migran al centro del óvulo y se produce la aposición pronuclear, prerequisite necesario para que ocurra el primer clivaje.

## 2. EL OXIDO NITRICO COMO MENSAJERO CELULAR EN MAMIFEROS

### 2.1. Introducción

El estudio de los nitratos en la fisiología celular de los mamíferos es una historia reciente. Green *y col.* (1981) evidenciaron por primera vez que las células de mamíferos son capaces de sintetizar nitratos en ausencia de patógenos. Stuehr y Marletta (1985) demostraron que la estimulación *in vitro* de los macrófagos con lipopolisacáridos (LPS) produce altos niveles de nitritos y nitratos. Trabajos posteriores determinaron que la L-arginina interviene en la citotoxicidad de los macrófagos y es el sustrato en la oxidación a nitritos y nitratos (Hibbs *y col.* 1987). Un año después, Marletta *y col.* (1988) establecieron que en macrófagos, el óxido nítrico (NO) es un producto intermediario en la oxidación de la L-arginina.

Paralelamente a estas investigaciones, Furchgott y Zawadzky, (1980) descubrieron un factor relajante derivado del endotelio (EDRF), el cual puede estimular directamente a la enzima guanilato ciclasa soluble (Ignarro *y col.* 1987). En 1987, se llegó a la conclusión que el NO posee la actividad biológica del EDRF (Palmer *y col.* 1987) y al igual que en macrófagos, las células endoteliales son capaces de sintetizar EDRF/NO a partir de L-arginina (Palmer *y col.* 1988a).

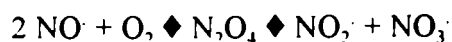
Durante estos últimos seis años muchos han sido los avances para elucidar el mecanismo de la síntesis del NO, los distintos tipos de enzimas involucrados y las funciones del NO en los diferentes sistemas. En las siguientes secciones se intentará resumir este progreso.

### 2.2. Biosíntesis del óxido nítrico

Las enzimas responsables de la síntesis del NO a partir de L-arginina se conocen como óxido nítrico sintasas (NOS o NO-sintasas) y no son consideradas como "sintetasas" porque no utilizan ATP en la reacción.

Hasta el momento, en mamíferos, se han clonado tres isoenzimas denominadas isoformas I, II y III. Todas las isoformas pertenecen a la familia de los citocromos P-450 (White y Marletta, 1992) pero se caracterizan por no ser proteínas integrales de membrana y por contener los dominios hemo y reductasa en el mismo polipéptido. Todas las NO-sintasas utilizan L-arginina como sustrato, con oxígeno molecular y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida (NADPH) como co-sustratos (Kwon *y col.* 1990). La síntesis de NO representa la oxidación de cinco electrones del grupo guanidino-nitrógeno de la L-arginina dando como

producto NO y L-citrulina en concentraciones equimolares. El oxígeno molecular es incorporado al grupo ureído de la citrulina y al NO en sí mismo (*Figura 1.5*). Posteriormente, se forman nitritos y nitratos, productos de oxidación del NO:



Además, la NO-sintasa requiere de diversos cofactores: tetrahidrobiopterina ( $\text{H}_4\text{B}$ ), flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN) (Stuehr *y col.* 1991; Mayer *y col.* 1991). De un modo semejante al de la enzima citocromo P450 reductasa (CPR), el NADPH reduce inicialmente al FAD, que a su vez reduce al FMN. El FAD y el FMN se hallan fuertemente unidos a la molécula de proteína mientras que el NADPH es un sustrato estequiométrico de la reacción.

Es interesante destacar que también se describieron NO-sintasas en artrópodos (insectos y crustáceos), gasterópodos y peces, sugiriendo que esta vía es uno de los sistemas regulatorios más antiguos en la fisiología animal (Moncada, 1992).

### 2.3. Enzimas óxido nítrico sintasas (NO-sintasas) en mamíferos

#### 2.3.1. Caracterización de las tres isoformas de NO-sintasas

##### 2.3.1.1. Isoforma I

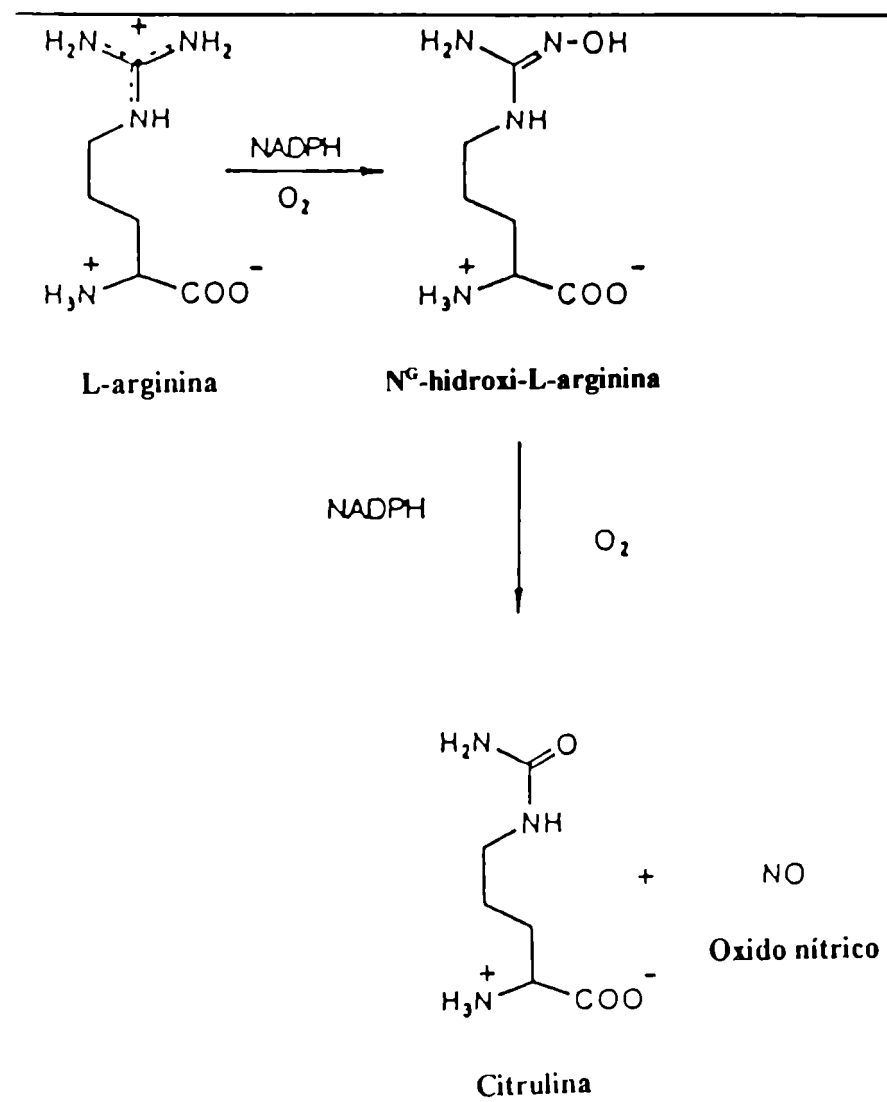
En la literatura, la isoforma I es también llamada NO-sintasa constitutiva (cNOS), "brain" NO-sintasa (bNOS) ó NO-sintasa neuronal (nNOS) por describirse primeramente en el sistema nervioso.

Esta isoforma posee una masa molecular de 150-160 kD (Schmidt *y col.* 1991), en su forma nativa es un dímero, se expresa constitutivamente tanto en la fracción citosólica (Mayer *y col.* 1990) como en la microsomal (Marletta, 1993) y es  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina dependiente.

La NO-sintasa I se encuentra descrita en cerebro, útero, estómago (Schmidt *y col.* 1992), en las glándulas adrenales (Dun *y col.* 1993) y en tejidos del tracto genital masculino (Chamness *y col.* 1995).

Esta isoforma aparece altamente conservada entre especies (93%) y conserva un 50% de homología con las otras dos isoformas. Recientemente, en humanos se identificó la localización de la NO-sintasa I en el cromosoma 12 (Xu *y col.* 1993a).





**Figura I.5: Reacción catalizada por la enzima NO-sintasa**

### 2.3.1.2. Isoforma II

Se la conoce también como NO-sintasa inducida (*i*NOS) ó como NO-sintasa de macrófagos (*mac*-NOS), ya que primeramente se la descubrió en estas células.

La isoforma II posee una masa molecular de 125-135 kD, es activa sólo como dímero y es predominantemente soluble (Stuehr *y col.* 1991). A diferencia de la isoforma I, se dice que la isoforma II es  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina independiente e inducible: en condiciones basales no se detecta proteína NO-sintasa II; estímulos como el LPS o el interferón gamma ( $\text{IFN}_{\text{gamma}}$ ) regulan a nivel transcripcional la síntesis de esta enzima.

La isoforma II se ha descrito en macrófagos murinos (Xie *y col.* 1992), células de músculo liso (Nunokawa *y col.* 1993), hepatocitos (Geller *y col.* 1993) y condrocitos (Charles *y col.* 1993). Conserva un 50% de homología con las demás isoformas y se ha localizado en el centrómero del cromosoma 17 (Xu *y col.* 1993b).

### 2.3.1.3. Isoforma III

La isoforma III se expresa en células endoteliales y también se conoce como NO-sintasa endotelial (*e*NOS). Su masa molecular es de 135 kD (Pollock *y col.* 1991), es un dímero (Mayer *y col.* 1990) y al igual que la isoforma I, se expresa constitutivamente y es  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina dependiente (entre 100 y 500 nM) (Förstermann *y col.* 1991).

La NO-sintasa III es 90% particulada. Una miristilación en la glicina amino terminal, es la responsable del anclaje de esta enzima a la membrana (Förstermann *y col.* 1991). Una sola sustitución aminoacídica en el sitio aceptor del ácido mirístico convierte a la isoforma III en una enzima 92% citosólica (Sessa *y col.* 1993).

La isoenzima III fue encontrada en el endotelio de vasos sanguíneos, pulmón, hígado (Springall *y col.* 1992) y riñón (Tracey *y col.* 1994). Posee un 50-60% de homología con las otras dos isoenzimas y en humanos se localiza en el cromosoma 7 (Marsden *y col.* 1993).

### 2.3.2. Regulación fisiológica de las NO-sintasas

La regulación biosintética del NO es muy importante, ya que una vez producido no puede ser almacenado ni inactivado. Es por eso que las tres isoformas descritas en la sección 2.3.1. están altamente reguladas. Algunos de los factores involucrados en esta regulación son

el  $\text{Ca}^{++}$ , la calmodulina, las fosforilaciones y los agentes supresores de la síntesis de NO como el monóxido de carbono (CO), citocinas y hormonas.

### 2.3.2.1. Isoforma I

Esta isoforma es  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina dependiente: es inactiva con 100 nM de  $\text{Ca}^{++}$  y totalmente activa a 500 nM (Förstermann *y col.* 1990). En el cerebro, el aminoácido glutamato actúa sobre el receptor NMDA disparando el influjo de  $\text{Ca}^{++}$ , el cual se une a la calmodulina y activa a la NO-sintasa I (Bredt y Snyder, 1994). Esta forma de activación permite la formación de NO en pocos segundos. La isoforma I es fosforilada por proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y calmodulina, por proteína quinasa C (PKC) y por proteína quinasa dependiente de GMP cíclico (GMPc) y de AMPc (Bredt *y col.* 1992). Estas fosforilaciones reducen significativamente la actividad de la NO-sintasa I (Dawson *y col.* 1993). Esto provee una fina regulación de la enzima. Por ejemplo, el NO estimula a la guanilato ciclasa (GC) que forma GMPc, el cual vía una proteína quinasa dependiente de GMPc inhibe a la NO-sintasa. Entonces, la forma activa de la NO-sintasa I es la enzima no fosforilada.

Rengasamy y Johns (1994) demuestran que otro nivel de regulación de la enzima es el mismo NO, el cual produce una retroalimentación negativa sobre la NO-sintasa de cerebelo bovino.

### 2.3.2.2. Isoforma II

La isoforma II no es estimulada por  $\text{Ca}^{++}$  ni bloqueada por antagonistas de la calmodulina. Sin embargo, en la secuencia aminoacídica de esta isoforma existe un sitio de unión a la calmodulina (Xie *y col.* 1992). Aparentemente, aún en ausencia de  $\text{Ca}^{++}$ , la calmodulina está fuertemente unida a la enzima y puede ser considerada como una subunidad de la enzima (Bredt y Snyder, 1994).

La caracterización de la región promotora del gen de la NO-sintasa II revela un patrón complejo de regulación. Existen dos sitios regulatorios "upstream" la secuencia TATA box; el primer sitio (desde la posición -48 a la -209) responde a LPS mientras que el segundo sitio (-913 a -1029) responde a  $\text{IFN}_{\gamma}$ . Este último sitio no regula directamente la expresión de la NO-sintasa sino que potencia la inducción por LPS (Lowenstein *y col.* 1993). Este tipo de organización de los "enhancers" puede ser muy importante en un proceso inflamatorio. Por

ejemplo, el LPS liberado por bacterias gram negativas estimula a los macrófagos. El  $\text{IFN}_{\gamma}$  elaborado por los linfocitos infiltrados aumenta la respuesta de los macrófagos al LPS. Así, la máxima producción de NO está restringida a aquellas células (macrófagos) que deben matar al invasor, minimizando daños en tejidos adyacentes (Bredt y Snyder, 1994).

A diferencia de las isoformas I y II, cuya liberación de NO es corta, una vez que la NO-sintasa II es inducida por citocinas la liberación de NO puede continuar durante días. Vodovotz *y col.* (1993) proponen que la regulación de la NO-sintasa inducible está sujeta a otros mecanismos además de la regulación a nivel transcripcional. Estos autores demuestran que el factor de crecimiento transformante beta ( $\text{TGF}\beta$ ) suprime la expresión de la NO-sintasa II disminuyendo la estabilidad y la traducción del RNA mensajero (RNAm) de la NO-sintasa II y aumentando la degradación de la proteína NO-sintasa II. Además, en otros trabajos se propone que la inducción de la isoforma II es también inhibida por corticoesteroides (Di Rosa *y col.* 1990) y citocinas como las interleukinas 4, 8 y 10 (Ding *y col.* 1990).

### 2.3.2.3. Isoforma III

La isoenzima III es regulada por  $\text{Ca}^{++}$  y calmodulina (Förstermann *y col.* 1991). En los vasos sanguíneos, la acetilcolina actúa sobre el receptor muscarínico de las células endoteliales activando el ciclo de los fosfoinosítidos con un consecuente aumento del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, el cual activa a la NO-sintasa III (Bredt y Snyder, 1994).

La fosforilación de la isoforma III regula tanto la actividad enzimática como la distribución subcelular de la enzima. Michel *y col.* (1993) encuentran que la NO-sintasa III se fosforila rápidamente en serina en respuesta a la bradicinina y se transloca de la fracción particulada a la citosólica. En el citosol, la isoforma III es catalíticamente inactiva; cuando no está fosforilada se localiza en la membrana plasmática donde genera NO, el cual es liberado al medio extracelular.

Recientemente se vio que el factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}_{\alpha}$ ) aislado o en combinación con la interleuquina 1 beta ( $\text{IL-1}_\beta$ ) produce una retroalimentación negativa sobre la NO-sintasa III tanto a nivel transcripcional como traduccional (Förstermann *y col.* 1994). Finalmente cabe agregar que tanto esta isoforma como las otras dos isoformas están reguladas negativamente por el monóxido de carbono (Nathan, 1992).

### 2.3.3. Regulación farmacológica de la síntesis de óxido nítrico

Al igual que los agentes fisiológicos, existen compuestos farmacológicos que pueden promover o antagonizar la producción de NO.

Los agentes que imitan la función de la enzima NO-sintasa se denominan generadores de NO. Estos incluyen a nitratos orgánicos como la nitroglicerina, al nitroprusiato de sodio (Butler *y col.* 1995); a los nitrosotioles como el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) y a los complejos de NO con nucleófilos (X) cuya fórmula:  $\text{XN}(\text{O}^-)\text{N}=\text{O}$  les otorga el nombre de "NONOates" (Maragos *y col.* 1991).

Los inhibidores de la NO-sintasa se dividen en cuatro clases:

- a- análogos competitivos de la L-arginina.
- b- compuestos con afinidad al grupo hemo de la NO-sintasa.
- c- compuestos que compiten con los cofactores de la NO-sintasa.
- d- sustancias que modifican a algún cofactor de la NO-sintasa.

Los análogos de la L-arginina son argininas modificadas en el átomo de nitrógeno del grupo guanidino terminal, son selectivos e inhiben competitivamente la actividad de la NO-sintasa cuando se agregan simultáneamente con la L-arginina. Algunos de los inhibidores más citados en la literatura son:  $\text{N}^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA),  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina ( $\text{NO}_2$ -arg),  $\text{N}^G$ -amino-L-arginina ( $\text{NH}_2$ -arg) y  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estos compuestos son enantiómeros específicos y varían su potencial inhibitorio según el tejido (Palmer *y col.* 1988b). Así, por ejemplo, en el endotelio la potencia relativa de tres compuestos es la siguiente ( $\text{NO}_2$ -arg >  $\text{NH}_2$ -arg > L-NMMA) (Lambert *y col.* 1991). Otros experimentos comprueban que el L-NAME es también más potente que el L-NMMA (Rees *y col.* 1990).

Los compuestos antes citados inhiben a todas las isoformas pero de manera diferencial, es decir, un compuesto es más potente para la isoforma I, mientras que otro inhibidor es más potente para la isoforma II ó III (Palmer *y col.* 1988b). Hasta el momento, se han descrito unos pocos compuestos que inhiben específicamente a la isoforma II, tal es el caso de la aminoguanidina (Misko *y col.* 1993) y de las amidas (Southan *y col.* 1995). Esto es importante ya que se van desarrollando productos farmacológicos que permiten inhibir selectivamente las distintas isoformas.

Otra clase de inhibidores son los que tienen afinidad por el grupo hemo de la NO-sintasa. Así, el NO producido por generadores de NO en altas concentraciones inhibe a la enzima como

también el monóxido de carbono (Nathan, 1992).

El difeniliodonio es otro inhibidor, que compite con algún cofactor para unirse a la NO-sintasa. Este compuesto modifica covalentemente a la enzima; la reversión sólo se observa con muy altas concentraciones de FAD, FMN ó NADPH (Nathan, 1992).

La cuarta clase de inhibidores está representada por sustancias que actúan sobre los distintos cofactores de la NO-sintasa. Tal es el caso de compuestos que poseen una pirimidina sustituida, la cual interfiere con la transformación de GTP a tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ); depletando así, a un cofactor necesario (la  $BH_4$ ) para estabilizar a las diferentes isoformas (Werner-Felmayer *y col.* 1990). Otros se caracterizan por unirse a la calmodulina de manera tal que impiden su unión a las isoformas I y III de la NO-sintasa (Nathan, 1992).

## **2.4. Blancos moleculares del óxido nítrico**

EL óxido nítrico es un radical y gas inorgánico cuya fórmula es  $\cdot N=O$ . Su reactividad química es semejante a la del oxígeno; ambos son oxidantes muy débiles y su capacidad para atacar moléculas biológicas es mínima. Sin embargo, posee alta reactividad con otros radicales libres y centros metálicos.

### **2.4.1. Proteínas con grupos metálicos**

El NO es considerado como un mensajero intra e intercelular. El primer efecto biológico del NO se observó sobre la enzima guanilato ciclasa (GC). El NO activa a la GC uniéndose al hierro del grupo hemo en el sitio activo de la enzima, alterando su conformación y aumentando su catálisis (Ignarro, 1990).

Otra enzima que puede ser activada por el NO es una ADP-ribosiltransferasa, la cual ribosila a una proteína de 39 kD (Hon Cheung, 1994). En el cerebro se sabe que el NO estimula la ADP-ribosilación de la gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (GADPH), inhibiendo su actividad (Lowenstein y Snyder, 1992).

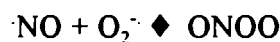
Por otro lado, el NO liberado por los macrófagos activados bloquea la respiración mitocondrial y la replicación del ADN. Este mecanismo citotóxico requiere gran cantidad de NO producido por la NO-sintasa II. Así, a nivel respiratorio, el NO se une al hierro de proteínas sin grupo hemo (Fe-S) como la NADH-ubiquinona oxidoreductasa, NADH-succinato oxidoreductasa y la cis-aconitasa, afectando su actividad (Nathan, 1992). La ribonucleótido

reductasa, enzima limitante en la síntesis de ADN también es inhibida con altas concentraciones de NO (Nathan, 1992).

En síntesis, el NO por su carácter de radical libre, oxida a diferentes compuestos. Entonces, las proteínas con grupos  $\text{Fe}^{2+}$  o con  $\text{S}^{2-}$  tienen la capacidad de ser oxidadas por el NO. La oxidación de estas enzimas ocasiona una estimulación o una inhibición de las mismas. Así, la guanilato ciclasa y la ADP-ribosa ciclasa se activan en presencia de NO, a diferencia de las enzimas responsables de la respiración mitocondrial y de la replicación que se inhiben cuando el NO está presente.

#### 2.4.2. Radicales libres

El NO posee gran reactividad con otros radicales como el anión superóxido, dando como resultado la formación del peroxinitrito (ONOO).



En condiciones fisiológicas, esta reacción se ve impedida por:

- la presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual captura al anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) manteniéndolo a bajos niveles.
- la alta concentración intracelular de SOD (100-1000 veces mayor), comparada con la concentración de  $\cdot\text{NO}$ .
- la baja concentración intracelular de  $\cdot\text{NO}$  (10 nM).

En condiciones patológicas las concentraciones de óxido nítrico y de anión superóxido están aumentadas a niveles cercanos al de la SOD endógena, con el consecuente aumento del peroxinitrito, el cual oxida directamente a los lípidos, sulfhidrilos, centros prostéticos con átomos de hierro y dedos de zinc.

#### 2.5. Fisiología del óxido nítrico

Virtualmente todas las células de mamíferos están bajo la influencia del NO. Las funciones del NO fueron descritas primeramente en tres sistemas fisiológicos (vascular, nervioso e inmune) y a partir de dicho estudio se fueron descubriendo funciones del NO en otros sistemas como el reproductor, respiratorio y excretor.

### **2.5.1. El óxido nítrico en el sistema vascular**

En el sistema vascular al igual que en otros sistemas, el NO proviene de dos o más fuentes celulares distintas creando una red de comunicación paracrina. Por ejemplo, el NO es sintetizado por células endoteliales, epiteliales y nervios adventicios (Schmidt y Walter, 1994). La acetilcolina u otros vasodilatadores se unen a sus receptores específicos en la membrana luminal de las células del endotelio y median la apertura de canales de  $\text{Ca}^{++}$ . Se dispara entonces, la actividad de la NO-sintasa gracias al efecto modulador del complejo  $\text{Ca}^{++}$ -calmodulina y el NO producido difunde hacia las células circundantes. En las células del músculo liso, el NO activa a la GC conduciendo a un marcado aumento de GMPc: la dilatación de las fibras musculares ocurre luego por un mecanismo que involucra la fosforilación de la cadena liviana de la miosina por una proteína quinasa dependiente del mismo GMPc (Schulz y Triggle, 1994).

### **2.5.2. El óxido nítrico en el sistema nervioso**

En el sistema nervioso, el NO actúa como un neurotransmisor y como una hormona. Sus funciones neuronales abarcan la transmisión periférica no adrenérgica-no colinérgica (NANC) en tejidos contráctiles y secretorios, la sinaptogénesis, el procesamiento del "input" sensorial, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. El NO también interviene en funciones patofisiológicas como la migraña, la epilepsia, el shock séptico, la neurotoxicidad y otras enfermedades neurodegenerativas (Schmidt y Walter, 1994).

### **2.5.3. El óxido nítrico en respuestas inmunológicas**

Con respecto al sistema inmune, el modelo más estudiado son los macrófagos. La síntesis de NO por parte de macrófagos activados (LPS y citocinas) produce efectos citotóxicos no específicos contra los microorganismos (bacterias y protozoarios) y en algunos casos contra células neoplásicas. Estos efectos citotóxicos son independientes de la fagocitosis y pueden ser citostáticos y/o citolíticos (Hibbs *y col.* 1990). Otro grupo de células del sistema inmune, los neutrófilos, también liberan NO ante la estimulación con quimioattractantes durante el transcurso de una respuesta inflamatoria, aunque todavía no se ha demostrado ninguna función del NO en las respuestas citotóxicas mediadas por neutrófilos (Schmidt y Walter, 1994).



#### **2.5.4. Oxido nítrico y reproducción**

El NO interviene en múltiples niveles del sistema reproductor. A nivel hipofisiario, el NO estimula la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (LH-RH) induciendo el comportamiento de apareo (Rettori *y col.* 1993). A nivel del tracto genital femenino modula la motilidad uterina en ratas estrogenizadas (Franchi *y col.* 1994), participa en el proceso de luteólisis (Motta *y col.* 1995), regula el flujo sanguíneo placentario y la nutrición fetal. Durante el parto, la expresión de la NO-sintasa decrece a fin de favorecer la contracción uterina mientras que la nitroglicerina interrumpe los partos prematuros (Schmidt y Walter, 1994).

En el macho, el NO induce la erección peniana (Lugg *y col.* 1995) y la NO-sintasa ha sido localizada en diferentes órganos del tracto genital masculino (Burnett *y col.* 1995). Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado la presencia de la NO-sintasa en la línea germinal masculina.

#### **2.5.5. El óxido nítrico en otros tejidos y células**

El NO participa en la regulación paracrina y autocrina de neurotransmisores, polipéptidos y en la secreción de iones. En el riñón interviene como parte de un mecanismo para regular el flujo renal (Wilcox *y col.* 1992), en el sistema pulmonar participa en la regulación de la presión vascular durante la hipoxia (Persson *y col.* 1990), en los hepatocitos posee efectos citostáticos durante el curso de una infección microbiana y en las células beta pancreáticas modula la liberación de insulina en respuesta a los niveles de L-arginina en plasma (Laychock *y col.* 1991).

### 3. PROSTAGLANDINAS Y COMPUESTOS RELACIONADOS

#### 3.1. Introducción

Las prostaglandinas (PGs) constituyen una familia de compuestos derivados de ácidos grasos naturales, se encuentran difundidos en numerosos tejidos de mamíferos, invertebrados e incluso en vegetales (Dickinson, 1976; Morse y col. 1977).

Se trata de lípidos de importante actividad biológica, cuya historia se remonta a 1929, cuando G.D. Burr y M.M. Burr documentaron la aparición de una "enfermedad carencial" en ratas mantenidas con dieta exenta de grasas, cuyas consecuencias podían revertirse con la administración de ácidos grasos no saturados de cadena larga como el ácido linolénico, araquidónico y linoleico.

En 1930, Kurzrok y Lieb (1930) encontraron que el fluido seminal humano fresco producía contracciones en el tejido uterino de la misma especie. Cuatro años más tarde, Von Euler (1936) en Suecia y Goldblatt (1933) en Inglaterra encontraron independientemente que extractos de vesícula seminal de carnero poseían actividad vasopresora y estimulante del miometrio. Von Euler asignó dicha actividad a un material ácido liposoluble al que denominó *prostaglandina*, presuponiendo un origen prostático.

Fue recién tres décadas más tarde que se llegó a conocer la estructura química de dos de estos compuestos, la PGE<sub>1</sub> y la PGF<sub>1</sub> (Bergström y Sjövall, 1957).

Poco tiempo después, Bergström y Samuelson (1963) diferenciaron y aislaron toda una serie de prostaglandinas, describiendo asimismo sus estructuras.

Las prostaglandinas, ampliamente difundidas en todos los sistemas biológicos, poseen una gran versatilidad en cuanto a sus funciones. Actúan sobre la presión arterial, tienen efectos sobre la agregación plaquetaria, provocan contracción ó relajación de diversos músculos lisos, quimiotaxis y quimioquinesis de células sanguíneas. Actúan además, en la luteólisis, la ovulación, la fertilización, la implantación embrionaria, en el trabajo de parto y en diversos mecanismos de secreción, modulando efectos hormonales y de neurotransmisión.

Su presencia en exceso es responsable de diversos desórdenes como procesos inflamatorios y alérgicos, alteraciones del ciclo sexual y abortos. Su deficiencia puede conducir a trastornos como la hipertensión arterial y la infertilidad.

### 3.2. Biosíntesis de los eicosanoides

#### 3.2.1. Relación con los ácidos grasos esenciales

Los ácidos grasos esenciales como el linoleico ( $C_{18:2}$ ) y el ácido linolénico ( $C_{18:3}$ ) sufren elongación y desaturación para formar: el ácido dihomo-gamma-linolénico ( $C_{20:3}$ ), el ácido araquidónico ( $C_{20:4}$ ) y el ácido 5-8-11-14-17-eicosapentanoico ( $C_{20:5}$ ), los cuales son sustrato para la síntesis de los eicosanoides (*Figura 1.6.*).

Los *eicosanoides* son ácidos grasos de 20 carbonos, polinsaturados e hidroxilados formados por las prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) y leucotrienos (LTs).

#### 3.2.2. Nomenclatura

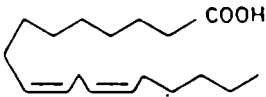
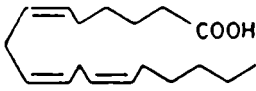
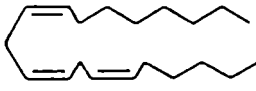
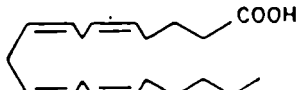
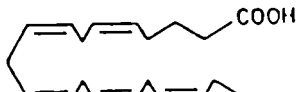
Estructuralmente, las prostaglandinas derivan de una molécula hipotética llamada *ácido prostanico*, el cual simboliza el esqueleto básico de las prostaglandinas (Richelsen y Beck-Nielsen, 1984). Contienen 20 átomos de carbono, están compuestas por un núcleo ciclopentano con dos cadenas laterales, y poseen un grupo 15-hidroxilo con un doble enlace en el carbono 13.

Se dividen en tres series de acuerdo con el grado de insaturación de sus cadenas laterales: *serie 1*: una doble ligadura en la cadena y deriva del ácido dihomo-gama linoleico; *serie 2*: dos dobles ligaduras en la cadena y se originan del ácido araquidónico; *serie 3*: con tres dobles enlaces y se sintetizan a partir del ácido eicosapentaenoico (*Figura 1.6.*).

La composición estructural del anillo pentano es fuente de otra clasificación y es la que define a las diferentes clases de prostaglandinas: A, B, C, D, E, F, G, H e I; diferenciándose entre sí en el carbono nueve (las del tipo E presentan un grupo ceto y las del tipo F un grupo oxhidrilo).

El subíndice alfa o beta describe la posición estequiométrica en 9 del anillo ciclopentano, así el grupo hidroxilo 9 de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  está orientado por encima del plano del anillo mientras que en  $\text{PGF}_{2\beta}$  se encuentra por debajo del plano del anillo.

Para los tromboxanos se utiliza una nomenclatura semejante, en donde la estructura hipotética es el ácido trombanoico.

ACIDO	ESTRUCTURA	PRODUCTO
linoleico (C <sub>18:2</sub> )		
	⇓	
linolénico (C <sub>18:3</sub> )		
	⇓	
dihomo-γ-linolénico (C <sub>20:3</sub> )		PGE <sub>1</sub> , F <sub>1α</sub> , TXA <sub>1</sub> , LTA <sub>3</sub> , LTC <sub>3</sub> , LTD <sub>3</sub> .
	8, 11, 14-EICOSATRIENOICO	
	⇓	
araquidónico (C <sub>20:4</sub> )		PGE <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> , F <sub>2α</sub> , I <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> , LT <sub>5</sub> : A <sub>4</sub> , B <sub>4</sub> , C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> .
	5, 8, 11, 14-EICOSATETRAENOICO	
	⇓	
(C <sub>20:5</sub> )		PGE <sub>3</sub> , D <sub>3</sub> , I <sub>3</sub> , TXA <sub>3</sub> , LT <sub>5</sub> : A <sub>5</sub> , B <sub>5</sub> , C <sub>5</sub> .
	5, 8, 11, 14, 17-EICOSAPENTAENOICO	

**Figura 1.6: Interrelación de las prostaglandinas y leucotrienos con los ácidos grasos esenciales. Los ácidos grasos con dos ó más dobles ligaduras (linoleico y linolénico) pueden sufrir desaturación y elongación para formar los sustratos de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos.**

### 3.2.3. Cascada del ácido araquidónico

#### 3.2.3.1. Origen del ácido araquidónico

La mayor parte de la información sobre la síntesis y el metabolismo de los eicosanoides está limitada a los productos del ácido araquidónico aunque es evidente que también se forman las otras familias de prostaglandinas derivadas del ácido dihomo-gamma-linolénico y del 5-8-11-14-17-eicosapentanoico.

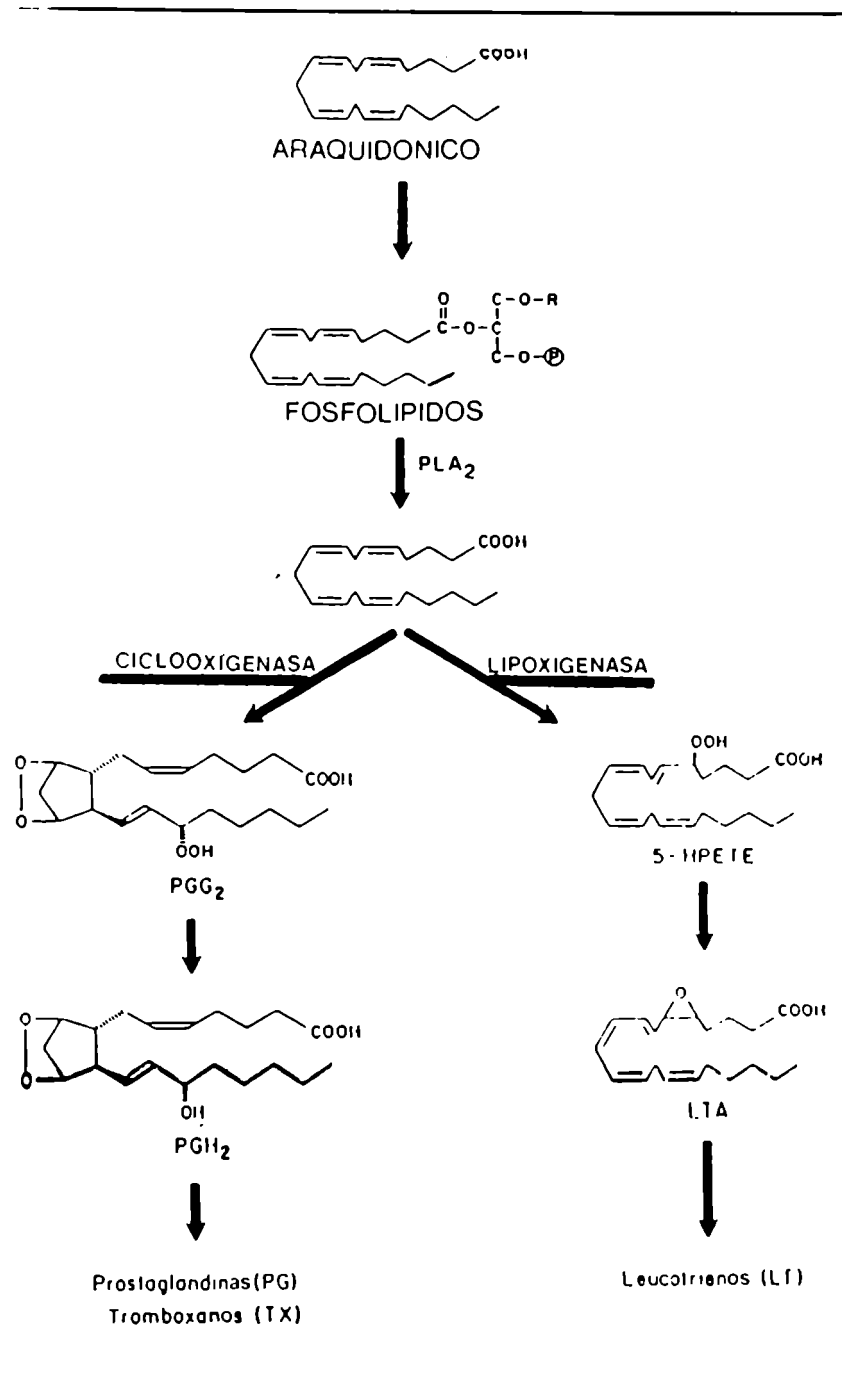
El ácido araquidónico se origina a partir de los ácidos grasos esenciales y también se obtiene con la dieta. La mayor parte del araquidónico se encuentra esterificado en "pooles" de fosfolípidos, triglicéridos y colesterol (Flower y Blackwell, 1976). Sin embargo, el araquidónico esterificado no es sustrato para la síntesis de eicosanoides, necesita ser liberado. La enzima PLA<sub>2</sub> moviliza el araquidónico de estos *pooles* y por lo tanto, regula la disponibilidad del sustrato (Ramwell y col. 1977).

La PLA<sub>2</sub> no es una única entidad molecular sino que existen varias isoformas (Galser y col. 1993). La isoforma principal es la PLA<sub>2</sub> de alto peso molecular presente en el citosol. Esta enzima es una fosfoproteína que es activada por una fosforilación en serina. En los casos en que las células son estimuladas por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) ó por el factor de crecimiento transformante alfa (TGF<sub>α</sub>), esta fosforilación puede ser catalizada por una proteína quinasa activada por mitógenos (MAP quinasa). Una vez fosforilada, la PLA<sub>2</sub> se transloca a la membrana donde se asocia de manera Ca<sup>++</sup> dependiente (Galser y col. 1993). El araquidónico ahora libre es convertido a PGs, TXs y LTs.

#### 3.2.3.2. Formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos

El ácido araquidónico libre es rápidamente oxidado a través de dos caminos principales e independientes (*Figura I.7*).

Un camino es catalizado inicialmente por la enzima prostaglandina H sintasa (PGH), también llamada *ciclooxigenasa* (COX) (Behrman y Romero, 1992), que lleva a la producción de PGs, TXs y prostaciclina (PGI). Hasta el momento, se han descrito dos isoformas de PGH sintasa: la primera se expresa constitutivamente y se denomina COX-1 mientras que la COX-2 se induce en respuesta a endotoxinas, factores de crecimiento, citocinas y ésteres de forbol (DuBois y col. 1994).



**Figura I.7: El ácido araquidónico esterificado es liberado por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y es metabolizado por la vía de la ciclooxygenasa ó de la lipoxigenasa.**

La COX-1 y la COX-2 son dependientes de un grupo hemo y catalizan la interacción entre una molécula de ácido araquidónico y dos moléculas de oxígeno para formar el endoperóxido PGG<sub>2</sub>. El grupo peróxido en la posición 15 del PGG<sub>2</sub> es rápidamente reducido para formar el endoperóxido PGH<sub>2</sub>. Estos dos intermediarios son precursores directos de la PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), TXA<sub>2</sub> y del ácido hidroxihapatadecatrienoico (HHT) (*Figura 1.8*).

El otro camino es catalizado por las enzimas conocidas como *lipoxigenasas* (15, 12 y 5), que dan origen a peróxidos intermedios como el ácido 15 hidroperoxi-5,8,10,14 eicosatetraenoico (15-HPETE), el 12 hidroperoxi-5,8,10,14 eicosatetraenoico (12-HPETE) y el 5 hidroxí-5,8,10,14 eicosatetraenoico (5-HPETE) respectivamente. A partir del 5-HPETE se origina el 5-HETE (5 hidroxí-5,8,11,14 eicosatetraenoico) y el leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), el cual podrá formar a su vez LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> (*Figura 1.9*) (Behrman y Romero, 1992).

### 3.2.4. Metabolismo de los eicosanoides

Los eicosanoides se sintetizan en las células de mamíferos en respuesta a estímulos de variada naturaleza (química, hormonal, física) (Harris *y col.* 1979; Piper y Vane, 1971). Hasta donde alcanza la evidencia experimental no se almacenan, se liberan luego de ser sintetizados y sirven como moduladores autocrinos y paracrinos de la función celular, ya que rápidamente son metabolizados.

La rápida pérdida de actividad biológica de las prostaglandinas y tromboxanos está asociada a la oxidación enzimática del grupo alcohol del carbono 15 y a las reacciones hidrolíticas espontáneas de PGI<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub> a 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> y TXB<sub>2</sub> respectivamente (Bendz, 1977).

La primera reacción está catalizada por la 15-hidroxi-prostaglandina deshidrogenasa (Nakano *y col.* 1969). Su vida media es corta y su velocidad de recambio está regulada por diferentes hormonas, principalmente por estrógenos (Blackwell *y col.* 1975).

La oxidación es seguida de una reducción del doble enlace 13-14 originando dihidroceto derivados, que son los principales metabolitos que se encuentran en la circulación periférica. Esta reacción es catalizada por una 13 reductasa (Samuelsson *y col.* 1971). La reacción mencionada es seguida por una beta oxidación de la cadena carboxilica lateral y eventualmente una omega oxidación de la cadena alquímica lateral (Hamberg, 1972) (*Figura 1.10*).

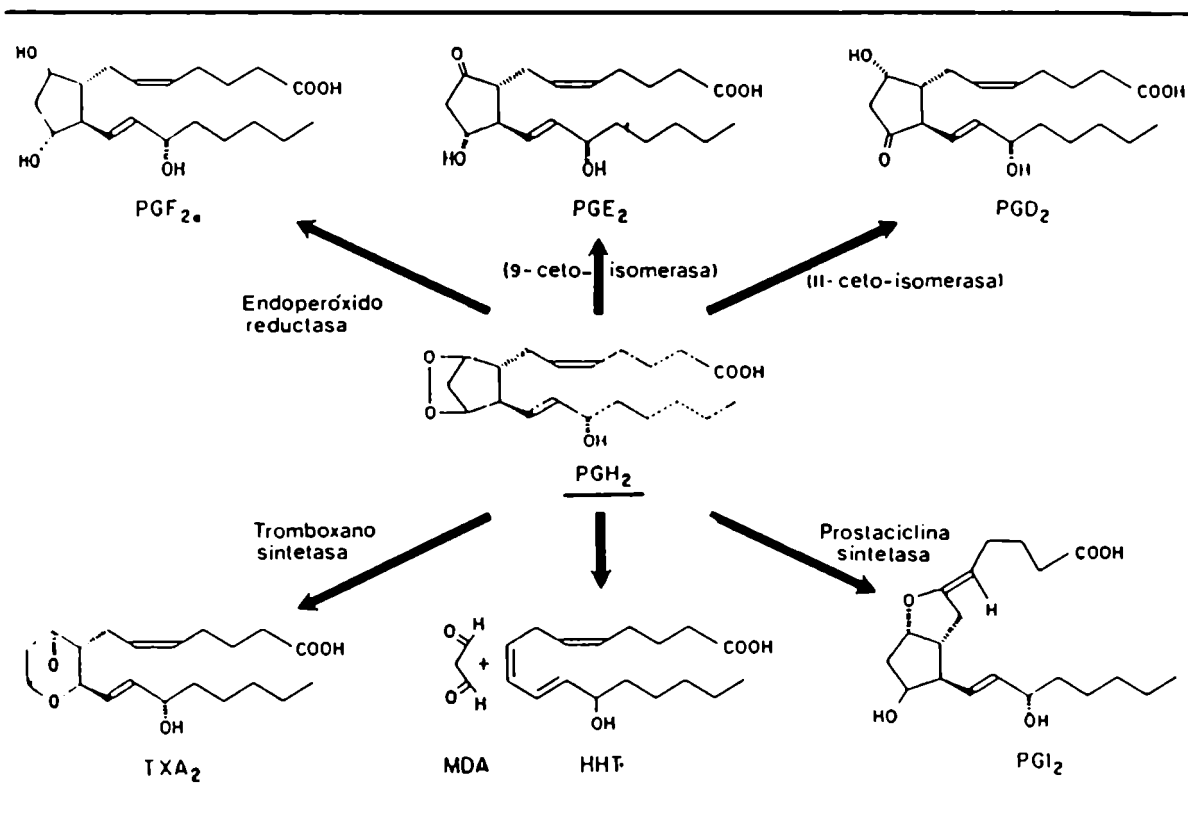
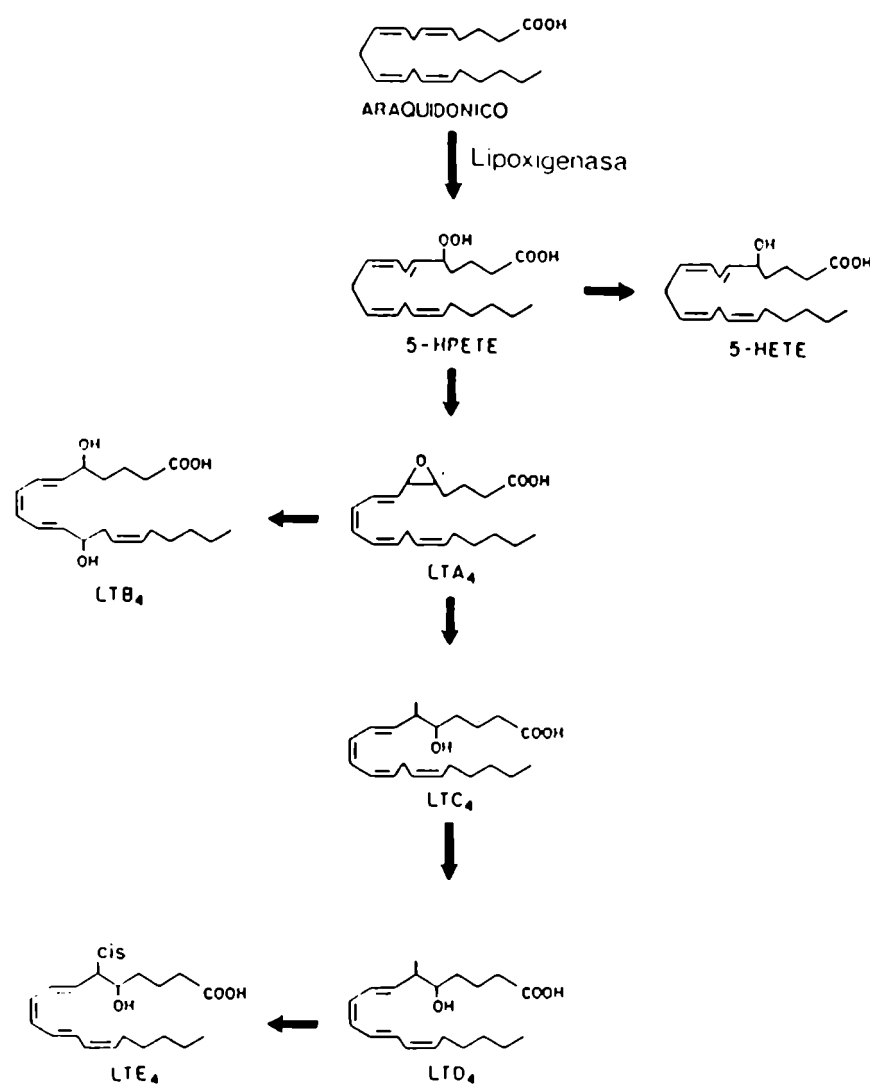
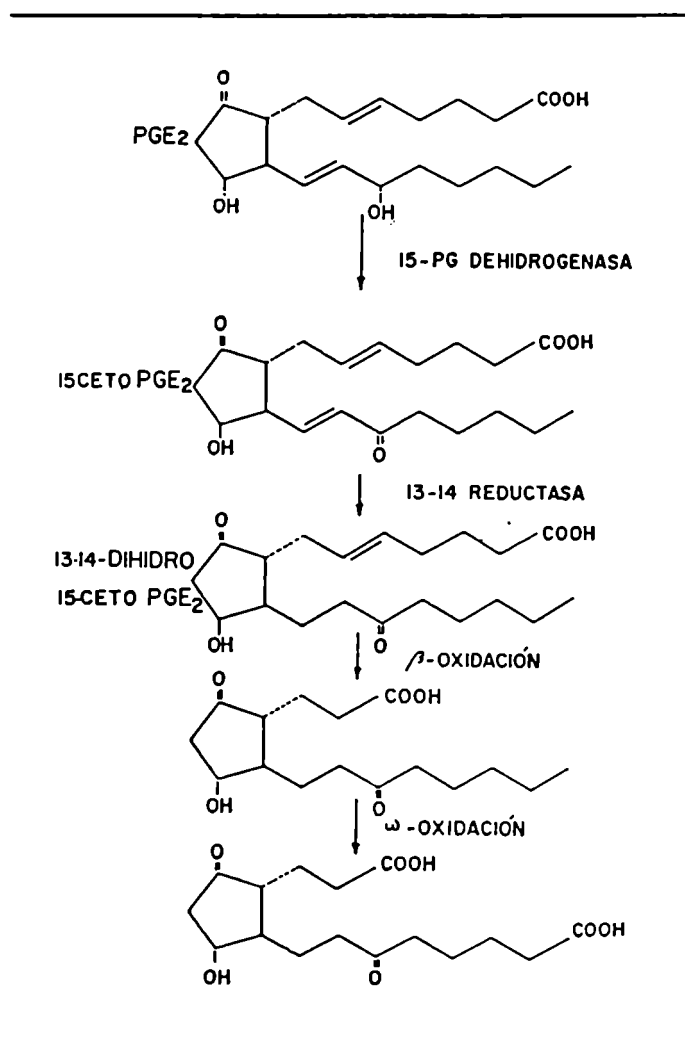


Figura I.8: Biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos. *MDA*: malondialdehído.





**Figura I. 9: Biosíntesis de leucotrienos.**



**Figura I.10: Metabolización de la PGE<sub>2</sub>.**

La metabolización de los leucotrienos supone diversos pasos inactivantes entre los cuales se describen mecanismos de clivaje peptídico (Fuchs, 1973), adición de residuos aminoácidos y oxidaciones (Hammarström, 1983), los cuales se llevan a cabo en hígado, riñón y pulmón.

### **3.3. Interacción entre las prostaglandinas y el óxido nítrico**

La interacción entre el NO y la actividad de las enzimas responsables de la síntesis de prostaglandinas (COX) es un descubrimiento reciente.

Se ha visto que las enzimas NO-sintasas comparten similitudes con las COX. Por ejemplo, muchos efectores de la producción de NO (bradicinina, LPS, IL-1 $\beta$ ) conducen a un aumento simultáneo de la síntesis de PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>. Este efecto sinérgico podría ser un mecanismo a través del cual los sistemas NOS y COX operan para amplificar respuestas fisiológicas o patológicas.

Además, dado que el NO estimula ó inhibe enzimas que contienen grupos con hierro se ha demostrado que las COX son blancos potenciales del NO porque poseen un grupo hemo-hierro en su sitio activo (Stamler, 1994). Trabajos realizados por Rettori *y col.* (1993) demuestran que el NO estimula la secreción de LH-RH vía el aumento de PGE<sub>2</sub> y posteriormente, Salvemini *y col.* (1993) establecen que el NO modula la actividad de las COX.

En nuestro laboratorio se observó que el NO estimula la motilidad uterina vía PGE<sub>2</sub> (Franchi *y col.* 1994). El NO producido por la NO-sintasa constitutiva representaría un estímulo constante para la activación de la COX-1. Por lo tanto, el rol que cumple el NO en la relajación del músculo liso podría no sólo atribuirse al aumento de GMPc sino también al aumento de AMPc vía activación de COX-1 y consecuente producción de PGE<sub>2</sub> (Salvemini *y col.* 1995).

Podemos sugerir entonces, que esta novedosa interacción entre la vía del óxido nítrico y la vía de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) es un mecanismo relevante para la regulación tanto de algunas funciones fisiológicas como de eventos patológicos (Di Rosa *y col.* 1996).

### **3.4. Efectos biológicos de los eicosanoides en el espermatozoide**

Todos los estudios relacionados con las PGs y la reproducción surgen a partir de la alta concentración de PGE (Samuelsson, 1963) y de 19-hidroxi PGE (Taylor y Kelly, 1974) halladas en el líquido seminal. Se han realizado muchos estudios intentando relacionar la fertilidad con la concentración de PGs en el semen. Sin embargo, los resultados son contradictorios: según

Cohen *y col.* (1977), las PGs inhiben la motilidad espermática mientras que Schlegel *y col.* (1981) observan una estimulación en la motilidad. Para Shalev *y col.* (1994) la presencia de un inhibidor de la ciclooxigenasa como la indometacina no produce cambios en la motilidad del espermatozoide.

Otro proceso en el cual las PGs están involucradas es la reacción acrosomal (Zaneveld *y col.* 1991; Breitbart *y col.* 1995). Según Meizel y Turner (1984) la  $\text{PGE}_1$  estimula la reacción acrosomal en espermatozoides de hamster mientras que Joyce *y col.* (1987) observan que el agregado exógeno de PGE revierte el efecto inhibitorio de la indometacina sobre dicho proceso.

Por otro lado, Aitken y Kelly (1985) establecen que la presencia de  $\text{PGE}_2$  en el medio de incubación de los espermatozoides aumenta la velocidad y la frecuencia de la rotación de la cabeza, así como el porcentaje de penetración en el test de hamster.

Con respecto a los productos derivados de la lipoxigenasa, Meizel y Turner (1984) encuentran que el 5-HPETE y el 5-HETE aumentan la reacción acrosomal en espermatozoides de hamster. Basuray *y col.* (1990) describen una disminución de la fertilización *in vitro* cuando los espermatozoides son incubados en presencia de un antagonista de los leucotrienos  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  y  $\text{LTE}_4$ .

Algunos autores postulan que las PGs ejercerían su acción mediante un aumento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular relacionado con la vía de la adenilato ciclasa (Villar *y col.* 1985). Sin embargo, hasta el momento poco se conoce sobre los mecanismos moleculares de los eicosanoides en la gameta masculina.

#### 4. HIPOTESIS DE TRABAJO

El estado actual de conocimientos acerca de las múltiples funciones que se le atribuyen al óxido nítrico y su reciente y relevante relación con el sistema reproductor nos permiten subrayar los antecedentes siguientes como punto de partida para elaborar una hipótesis de trabajo:

1) estudios realizados en nuestro laboratorio establecen que el útero y el oviducto de ratas estrogenizadas son capaces de sintetizar NO (Suburo *y col.* 1995; Perez Martinez *y col.* 1996). Además, demostramos que el NO estimula la síntesis de PGs uterinas (Franchi *y col.* 1994).

2) trabajos de Burnett *y col.* (1995) localizan la NO-sintasa en el tracto reproductor masculino.

3) los leucocitos presentes en infecciones urogenitales producen una elevada cantidad de NO que conllevan a la pérdida de motilidad espermática (Tomlinson *y col.* 1992).

4) bajas concentraciones de NO estimulan el proceso de lipoperoxidación en el espermatozoide (Hellström *y col.* 1994).

En base a los datos señalados en los puntos 1, 2, 3 y 4 sospechamos que el espermatozoide es capaz de sintetizar NO, ésto es que posee la enzima NO-sintasa.

Además, dado que el NO es considerado como un mensajero intra e intercelular y que en el proceso de fertilización existen mecanismos altamente regulados y ordenados, sospechamos que el NO participa en la motilidad y en la reacción acrosomal.

En este contexto, los objetivos de este trabajo se circunscriben a:

1) evidenciar mediante ensayos farmacológicos la presencia de la NO-sintasa en el espermatozoide murino. Para ello, se realizarán ensayos de fertilización *in vitro* y se evaluarán los patrones de motilidad espermática y de reacción acrosomal espontánea e inducida por progesterona.

2) evidenciar mediante técnicas inmunológicas (Western Blot e inmunofluorescencia indirecta) la presencia de la NO-sintasa en el espermatozoide murino.

3) determinar si el espermatozoide de ratón es capaz de sintetizar NO.

4) establecer si el espermatozoide murino sintetiza prostaglandinas e hidroxiácidos, los cuales intervienen en la reacción acrosomal e investigar como posible mecanismo de acción, la relación entre las prostaglandinas y el NO en la gameta masculina de ratón.

## **CAPITULO II**

### **Materiales y Métodos**

## 1. ANIMALES Y MEDIO UTILIZADOS

### 1.1. Animales

Se trabajó con ratones híbridos (♀C57B x ♂CBA) F1 machos adultos y hembras prepúberes. Los animales fueron mantenidos con un régimen de luz diaria de 14 hs, en ambiente climatizado (22-24°C) y alimentados con alimento balanceado Purina y agua "ad libitum".

### 1.2. Medio de cultivo definido

En todos los casos, el medio de cultivo utilizado fue el denominado medio de fertilización (MF) (Whittingham, modificado por Fraser y Drury) (1975), adicionado con 3% de seroalbúmina bovina (BSA) y previamente equilibrado bajo una atmósfera de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C.

Para la preparación del MF la calidad del agua es crítica, por ser un factor limitante para el desarrollo normal de las gametas (Bavister, 1989); por lo tanto utilizamos agua para cultivo de embriones esterilizada (Sigma Chem.Co.) y siempre el medio se filtró (filtros Corning) bajo flujo laminar. Los inhibidores y los generadores de NO se prepararon diariamente en MF.

#### MEDIO DE FERTILIZACION (MF)

Compuesto	g/100 ml
NaCl	0.5803
NaHCO <sub>3</sub>	0.2106
Glucosa	0.1000
KCl	0.0201
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.0056
Piruvato de sodio	500 µl
Penicilina	0.0063
Estreptomicina	0.0050
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.0264
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0.0102
Lactato de sodio	350 µl
Rojo fenol	0.0013
BSA	3.0000



## **2. TECNICA DE FERTILIZACION *IN VITRO***

Durante los años 1954-59, los investigadores Thibault y *col.* (1954) y Chang (1959) desarrollaron por primera vez la técnica de fertilización *in vitro*. Sin embargo, hasta fines de la década del '80 las condiciones metodológicas fueron muy poco reproducibles.

Actualmente, una exitosa fertilización (80-90% de ovocitos fertilizados) depende de las condiciones de "housing" de los animales, de las cepas utilizadas, del protocolo de estimulación de la ovulación, de la calidad de los ovocitos, de una buena motilidad espermática, de una óptima concentración de espermatozoides durante la capacitación y de una baja concentración espermática durante la inseminación. Además, la determinación de un medio definido (MF) ha contribuido a la gran reproducibilidad que posee el método de fertilización *in vitro*.

### **2.1. Preparación de las cápsulas para la fertilización**

En cajas de Petri Corning 60 x 15 mm se dispusieron gotas (150-200  $\mu$ l) del MF, donde posteriormente se incubaron los ovocitos y los espermatozoides. Las gotas se cubrieron rápidamente con 10 ml de vaselina líquida (Parafarm, Argentina) para evitar la evaporación. El volumen de aceite está estandarizado para lograr una profundidad constante sobre cada gota y una tensión de gas uniforme ( $O_2$  y  $CO_2$ ). Seguidamente, las cajas de Petri preparadas se incubaron durante 30 min en la estufa para lograr un equilibrio (5%  $CO_2$  en aire, 37°C, pH=7.4) entre el MF y el aceite.

### **2.2. Preparación de las gametas**

#### **2.2.1. Preparación de la suspensión de espermatozoides**

Los machos adultos se sacrificaron por dislocación cervical. El epididimo caudal se colocó en una caja de Petri con MF. Luego, se lo sumergió en la gota de MF (200  $\mu$ l) bajo aceite y se extrajeron los espermatozoides por punción con la ayuda de un microscopio binocular y bajo cámara de flujo laminar. La densa masa de espermatozoides se dejó 5 min en la estufa gaseada para facilitar su dispersión. Una buena muestra de espermatozoides se caracteriza por presentar una óptima dispersión en el MF al cabo de ese tiempo (Bavister, 1989).

En nuestro diseño experimental fueron dos los factores que tuvimos en cuenta para lograr una buena capacitación espermática. El primero fue la motilidad espermática inicial de

cada muestra y el segundo una óptima concentración de espermatozoides, ya que en el proceso de capacitación las células compiten por los diferentes sustratos. Por ejemplo, una alta concentración espermática favorecerá sólo a unos pocos espermatozoides a capacitarse. Entonces, a continuación determinamos la concentración espermática y el porcentaje de células móviles, a fin de obtener una suspensión de  $10^6$  células/ml con una motilidad inicial mayor al 60%. Estas determinaciones se realizaron bajo cámara de Neubauer. La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\frac{\text{número de espermatozoides}}{\text{número de cuadrantes contados (5)}} \times \text{la inversa de la dilución} \times 10^4$$

El resultado queda expresado como  $10^X$  células/ml.

El tiempo de capacitación espermática en el ratón oscila entre los 90-120 min; por lo tanto los espermatozoides se incubaron durante 120 min en gotas de 200  $\mu$ l de MF ó en MF adicionado con diferentes drogas. Las drogas utilizadas se agregaron durante el período de capacitación.

### 2.2.2. Obtención de los ovocitos

Con el fin de inducir la superovulación, primeramente se inyectaron 10 unidades internacionales (UI) de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) a cada una de las hembras por vía intraperitoneal y a las 48 hs siguientes se inyectaron 10 UI de hCG (human Chorionic Gonadotrophin). Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical a las 14-16 hs después de la última inyección, se removieron los oviductos y se los colocó en caja de Petri con MF. Bajo microscopio binocular y en cámara de flujo laminar, se sumergieron los oviductos en una gota de MF (150  $\mu$ l) cubierta con aceite y se los cortó para expulsar los ovocitos. Finalmente, los ovocitos se distribuyeron en gotas con MF (10 ovocitos/150  $\mu$ l) y se incubaron en la estufa hasta el momento de la inseminación.

### **2.3. Inseminación de gametas. Observación de pronúcleos**

Al cabo de los 120 min de incubación de los espermatozoides, los ovocitos se inseminaron con una concentración de espermatozoides de  $10^5$  células/ml, concentración óptima para evitar la polispermia (Bavister, 1989).

En la técnica de fertilización *in vitro* se han descrito una serie de signos morfológicos utilizados como criterio de fertilización (Yanagimachi, 1994):

1. presencia de la cola del espermatozoide en el ooplasma.
2. engrosamiento de la cabeza del espermatozoide en el ooplasma.
3. presencia de pronúcleos masculino y femenino.
4. presencia del primero y segundo cuerpo polar.
5. presencia del espermatozoide en el espacio perivitelino.
6. activación del ovocito con pérdida de gránulos corticales y rotación del huso meiótico.

No todos los signos son necesariamente apropiados para todas las especies. En el caso del ratón, la presencia de la cola del espermatozoide en el ooplasma no se utiliza como criterio, ya que ésta se desintegra rápidamente. Los demás criterios se pueden utilizar y muchas veces algunos de ellos (2 y 6) son revelados por diferentes tinciones.

En este trabajo, el criterio utilizado fue la observación de los pronúcleos masculino y femenino al cabo de las 8 hs post-inseminación. Se realizó bajo microscopio invertido con contraste de fase y se determinó el porcentaje de ovocitos con dos pronúcleos (% de fertilización).

### **3. MEDICION DE LA MOTILIDAD ESPERMATICA**

Con el fin de determinar la motilidad espermática, los espermatozoides se incubaron en MF en presencia de distintas drogas adicionadas a diferentes tiempos durante la capacitación.

La motilidad se evaluó examinando a los espermatozoides en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido y determinando el porcentaje de espermatozoides móviles, inmóviles e hiperactivados a diferentes tiempos de incubación. Los espermatozoides hiperactivados se identificaron por el gran movimiento en forma de "látigo" que presenta el flagelo y por poseer motilidad no progresiva intercalada con pequeños episodios de motilidad lineal progresiva (Yanagimachi, 1994).

En algunas muestras se determinó el porcentaje de células vivas mediante la tinción con eosina.

#### 4. DETERMINACION DE LA REACCION ACROSOMAL POR HOS-SPERMAC

El estudio de la reacción acrosomal en el ratón siempre fue dificultoso debido a que el capuchón acrosomal es pequeño y difícil de detectar con el microscopio óptico.

Varios métodos se han ensayado para describir la reacción acrosomal en el espermatozoide murino. El método de la clortetraciclina (CTC) (Ward y Storey, 1984) es el único capaz de diferenciar espermatozoides capacitados y reaccionados, pero posee algunas desventajas: (a) los preparados deben examinarse rápidamente y no pueden guardarse mucho tiempo ya que la fluorescencia decae rápidamente y (b) los patrones de fluorescencia son difíciles de distinguir.

Por otro lado, la técnica desarrollada por Dudenhausen y Talbot (1982) (tinción triple) permite guardar los preparados indefinidamente y requiere de un equipamiento de laboratorio standard. Sin embargo, el procedimiento es tedioso y muchas veces el colorante azul tripan se pierde con las sucesivas fijaciones y lavados (Kovacs y Foote, 1994).

La coloración Spermac se desarrolló para determinar la morfología de espermatozoides humanos y es una modificación de la coloración Papanicolaou (Oettlè, 1986). Oettlè y Soley (1986) utilizan la coloración Spermac para detectar el capuchón acrosomal en espermatozoides humanos, bovinos, caninos y murinos y la corroboran por microscopía electrónica.

Este método es simple, rápido y de bajo costo. Sin embargo, para que esta coloración sea realmente útil en el ensayo de reacción acrosomal, debe existir un paso que discrimine entre espermatozoides vivos y muertos. Jeyendran *y col.* (1984) desarrollaron un test que utiliza un medio hipo-osmótico para medir la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides humanos. Este método provee un medio simple para comprobar la viabilidad del espermatozoide y presenta algunas ventajas sobre las técnicas con tinciones de exclusión y fluorocromos.

En nuestro laboratorio desarrollamos la técnica denominada **HOS-Spermac**, la cual es una tinción simple (Spermac) (Oettlè, 1986; Chan, 1996) combinada con el test hipo-osmótico (HOS) (Jeyendran *y col.* 1984; Rogers y Parker, 1991). Esta nueva metodología se asemeja a la propuesta por Aitken *y col.* (1993) para espermatozoides humanos, porque permite detectar simultáneamente la presencia del capuchón acrosomal y la viabilidad espermática.

Spermac es un kit de tres tinciones (A, B y C) y una solución fijadora (formaldehído) (tinción Spermac, Stain Enterprises, Onderstepoort, Sud Africa). El contenido de las tinciones es secreto (Dr. E. Oettlè, comunicación personal). En estudios comparativos de microscopia óptica y electrónica se demostró que la tinción "C" (verde) es específica y semi-cuantitativa para el citoplasma, particularmente el acrosoma. Asimismo, la tinción "A" (roja) es específica y semi-cuantitativa para los contenidos nucleares (Oettlè y Soley, 1988).

Brevemente, se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ l de la suspensión de espermatozoides, se transfirieron a tubos Eppendorf con 200  $\mu$ l de medio hipo-osmótico (MHOS = 7.35 g de citrato de sodio y 13.51 g de fructosa en un litro de agua destilada) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a 500 x g durante 5 min y el pellet se resuspendió en 20  $\mu$ l de MHOS. Las suspensiones se extendieron en portaobjetos y se dejaron secar; inmediatamente después se fijaron con 5% formaldehído en agua destilada (v/v) durante una hora. Luego de la fijación, los extendidos se lavaron tres veces en agua destilada, se sumergieron 1 min en la tinción "A" y 2 min en la tinción "B" y "C". Entre cada tinción, los preparados se enjuagaron en agua destilada. Se dejaron secar y se examinaron (sin montar) bajo microscopio de campo claro a 1000 x con aceite de inmersión.

Con la tinción Spermac, la presencia del capuchón acrosomal del espermatozoide murino, cuando está presente, se revela como una banda verde sobre la cabeza, cuyo núcleo se tiñe de rojo (Herrero y col. 1995). En todos los ensayos, tanto el "swelling" (espermatozoides viables) como la presencia del capuchón acrosomal se determinó en al menos 100 espermatozoides. Estos se clasificaron en cuatro categorías según la siguiente tabla:

	<b>hinchados</b>	<b>no hinchados</b>
<b>capuchón acrosomal visible</b>	vivo, no reaccionado	muerto, intacto
<hr/>		
<b>capuchón acrosomal ausente</b>	vivo, reaccionado	muerto, acrosoma degenerado

El porcentaje de espermatozoides reaccionados se calculó excluyendo los no viables.

A continuación, detallamos los experimentos realizados para convalidar esta metodología.

#### 4.1. Correlación entre viabilidad espermática vs. "swelling"

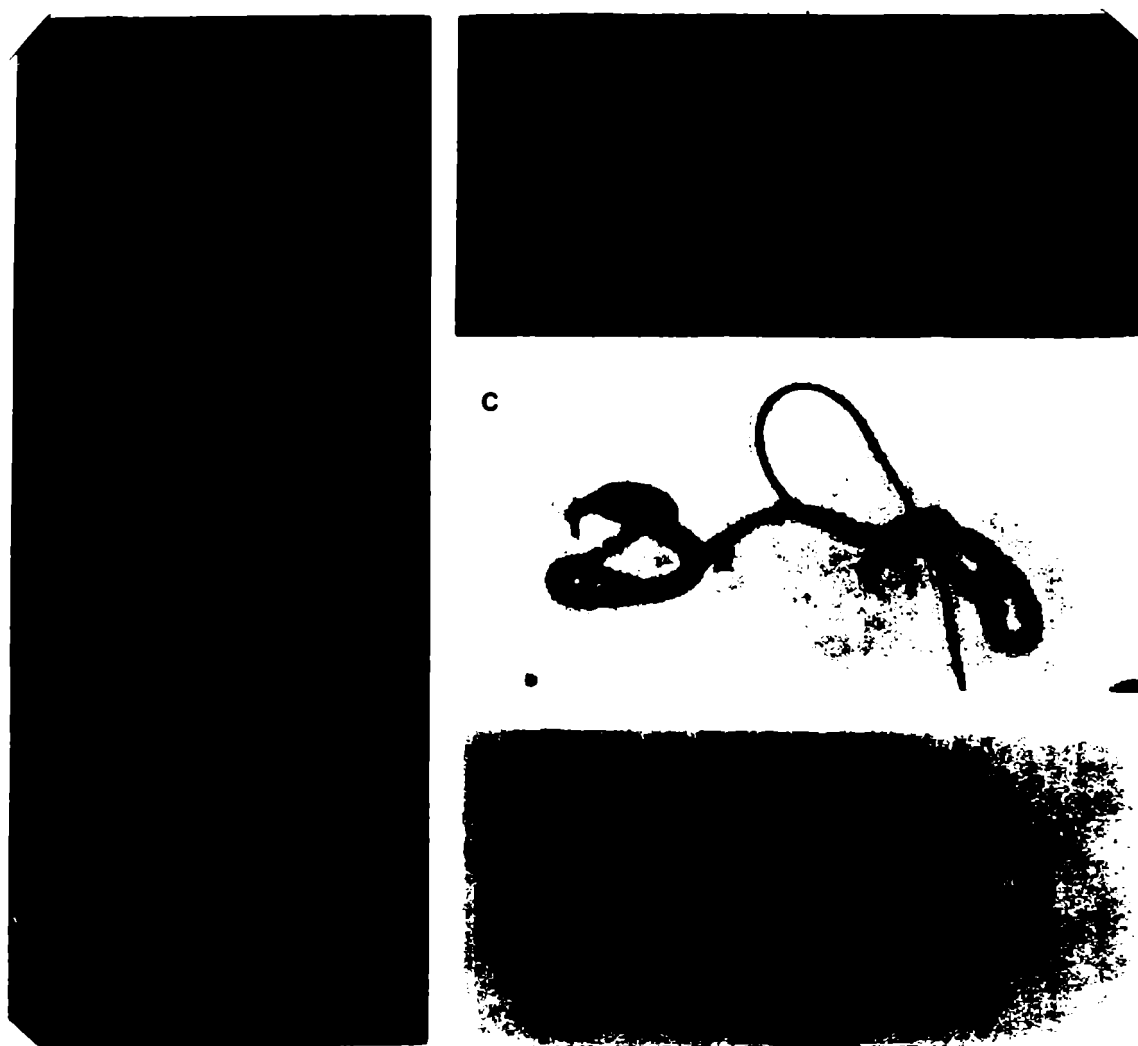
La *Figura II.1* muestra patrones típicos de "swelling" (hinchados) hallados con la tinción HOS-Spermac. Los espermatozoides hinchados son fáciles de diferenciar de los espermatozoides no hinchados. La forma más frecuente de hinchazón es la cola enrollada (*Figura II.1.C*). Algunos espermatozoides sólo tienen un pequeño rulo en la punta de la cola (*Figura II.1.D*), mientras que otros presentan la cola doblada sobre sí misma (*Figura II.1.B*). Las *Figuras II.1.A* y *B* muestran espermatozoides que presentan el capuchón acrosomal; éste se ve como una banda verde sobre la cabeza del espermatozoide teñida de rojo.

Mediante la técnica de HOS-Spermac, el porcentaje de espermatozoides hinchados luego de la incubación en un medio hipo-osmótico deberá reflejar el porcentaje de espermatozoides vivos. Para verificar esta hipótesis, se tomaron 11 muestras elegidas al azar; se determinó el porcentaje de células vivas mediante la tinción de exclusión de eosina y se correlacionó este porcentaje con el obtenido por la técnica HOS-Spermac. El coeficiente de correlación obtenido entre ambos métodos ( $R = 0.8633$ ) fue significativamente diferente de 0 ( $P < 0.01$ ). Para corroborar HOS-Spermac en un amplio rango de viabilidades, se examinaron muestras con una concentración conocida de espermatozoides muertos. Los resultados obtenidos con HOS-Spermac correspondieron con los valores esperados de viabilidad (*Tabla II.1*). La variación interensayo de HOS-Spermac fue menor al 10%, excepto en la muestra con 10% de viabilidad (24%).

#### 4.2. Comparación entre el ensayo de fluorescencia de la clortetraciclina (CTC) y el método de HOS-Spermac

Para verificar los resultados obtenidos por HOS-Spermac, este método y el ensayo del CTC se realizaron simultáneamente en tres muestras distintas incubadas 120 min en presencia ó en ausencia de  $10 \mu\text{M}$  de A23187 (ionóforo de  $\text{Ca}^{++}$ ), el cual se agregó luego de 90 min de comenzada la incubación. Los resultados obtenidos por CTC y por HOS-Spermac fueron semejantes tanto en el grupo control como en el grupo con el ionóforo de  $\text{Ca}^{++}$  (*Figura II.2*). La viabilidad luego de 120 min fue de  $62.9 \pm 1.2$  en el control y  $62.0 \pm 0.7$  en el grupo tratado con ionóforo (media  $\pm$  S.E.M.; N.S.).

Por lo tanto, en los experimentos desarrollados en este trabajo de tesis, se midió la reacción acrosomal murina con el método HOS-Spermac.

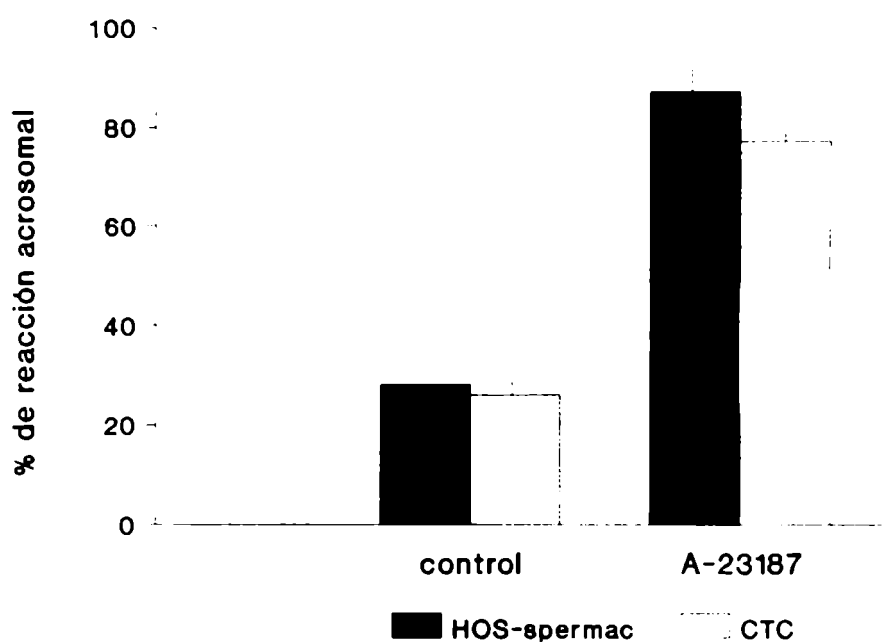


**Figura 11.1:** Patrones típicos de "swelling" (hinchados) hallados con la tinción HOS-Spermac en espermatozoides maduros de ratón. Las figuras B, C y D muestran las formas más frecuentes de "swelling": cola doblada sobre sí misma (B); cola enrollada (C); pequeño rulo en la punta de la cola (D). Además, las figuras A y B muestran espermatozoides que presentan el capuchón acrosomal (Ac) como una banda verde sobre la cabeza teñida de rojo.

<i>Viabilidad esperada (%)</i>	<i>Viabilidad según HOS-Spermac (media + S.E.M..)</i>	<i>Variación entre ensayos</i>	<i>Intervalo de confianza (95%)</i>
10	8.3 ± 1.1	24.0	3.3 - 13.2
20	19.5 ± 0.8	7.6	15.7 - 23.2
30	29.3 ± 1.1	6.4	24.5 - 34.0
40	38.0 ± 1.2	5.7	32.5 - 43.5
50	49.3 ± 0.9	3.4	46.8 - 71.2
60	59.0 ± 2.8	8.3	45.1 - 53.5

**Tabla IL1: Confirmación de la viabilidad espermática por HOS-Spermac.** Una suspensión de espermatozoides de ratón se calentó (espermatozoides muertos) y luego pequeñas alícuotas de esa suspensión se adicionó a otra suspensión espermática con alta motilidad, a fin de obtener un amplio rango de viabilidades. Los volúmenes de la suspensión de espermatozoides muertos se ajustaron de manera de obtener valores de viabilidad entre 10% a 60%; estos valores se confirmaron por la técnica de exclusión con eosina. La viabilidad de las muestras fue corroborada por triplicado por HOS-Spermac y se comparó con los valores esperados. La variación interensayo de HOS-Spermac fue menor al 10%, excepto en la muestra con 10% de viabilidad espermática.





**Figura II.2:** Los espermatozoides de ratón se capacitaron en MF durante 90 min. Luego se adicionó 10  $\mu$ M de A23187 (ionóforo de  $\text{Ca}^{++}$ ) ó el vehículo (DMSO 0.01%, v/v) por otros 30 min. A los 120 min de incubación se determinó en todas las muestras el porcentaje de reacción acrosomal por HOS-Spermac y por el ensayo de la clortetraciclina (CTC). Los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron semejantes, tanto en el grupo control como en el grupo tratado con el ionóforo. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos.

#### **4.3. Medición de la reacción acrosomal espontánea**

En los ensayos para determinar la reacción acrosomal espontánea, es decir, en ausencia de un inductor fisiológico, los espermatozoides se incubaron 240 min en MF ó en MF adicionado con distintas drogas. A diferentes tiempos de incubación se extrajeron alícuotas y se midió la presencia del capuchón acrosomal mediante la técnica HOS-Spermac.

#### **4.4. Medición de la reacción acrosomal inducida por progesterona**

La reacción acrosomal puede inducirse en espermatozoides capacitados por factores tales como el fluido folicular, la zona pelúcida y la progesterona entre otros. Basándonos en un trabajo de Roldán *y col.* (1994), utilizamos progesterona como inductor de espermatozoides murinos.

En nuestro sistema, los espermatozoides se incubaron en MF durante 120 min a fin de lograr la capacitación espermática y luego se adicionó 10, 15 ó 20  $\mu\text{M}$  de progesterona durante otros 15 min. La solución stock de progesterona (15 mM) fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO), se conservó a 4°C y se utilizó durante el transcurso de una semana. Las diluciones siguientes se realizaron diariamente en MF.

Luego de realizar la curva concentración-respuesta de progesterona se realizó el siguiente diseño experimental: en un grupo los espermatozoides se capacitaron durante 120 min y luego se adicionó 15  $\mu\text{M}$  de progesterona durante 15 min más. A otros tres grupos experimentales se adicionaron distintas drogas a diferentes intervalos de tiempo del proceso de capacitación (tiempo 0, 60 ó 90 min); transcurridos 120 min del comienzo de la incubación se agregó progesterona (15  $\mu\text{M}$ ) y se incubó durante otros 15 min. Además, a un grupo de espermatozoides, previamente capacitados (120 min), se los trató con un generador de NO (spermine NONOate) durante 15 min. En este grupo, no se adicionó progesterona.

En todos los casos, al cabo de los 135 min de incubación, el status acrosomal de los espermatozoides se reveló con la técnica HOS-Spermac.

### **5. LOCALIZACION POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA DE LA NO-SINTASA ESPERMATICA**

Los espermatozoides del epidídimo caudal de ratón fueron incubados en MF a 37°C en

5% CO<sub>2</sub> en aire. La concentración final fue de 10<sup>6</sup> células/ml y un volumen final de 300 µl. A diferentes intervalos de tiempo cada gota de 300 µl se centrifugó a 700 x g durante 10 min y el precipitado fue resuspendido en PBS. Este procedimiento de lavado se repitió tres veces. La suspensión final de espermatozoides se extendió sobre portaobjetos, se secó a temperatura ambiente y se fijó en una solución de formaldehído en PBS al 2% (v/v) durante 10 min.

Se utilizó como primer anticuerpo una IgG anti-NOS neuronal (NOS-B) proveniente de suero de conejo (RPMS/Wellcome, (Beckenham, Kent, Reino Unido), cuya especificidad había sido previamente demostrada (Springall *y col.* 1992).

Los extendidos se incubaron 30 min a 37°C en una solución de PBS suplementado con leche descremada 2% (v/v) y Tween 20 0.02% (v/v) (Sigma Chem.Co., St. Louis). Luego, esta solución se aspiró y los extendidos se incubaron 18-22 hs a 4°C con el anticuerpo NOS-B (primer anticuerpo). Otros extendidos fueron incubados en paralelo con PBS-BSA 0.5% ó suero normal de conejo para obtener los correspondientes controles negativos. Tanto el anticuerpo NOS-B como el suero normal de conejo se diluyeron 1:100 en PBS-BSA 0.05% (p/v).

Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal para IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:50) (Sigma Chem.Co.). Al día siguiente de la incubación con el primer anticuerpo, los extendidos se lavaron con PBS y se incubaron 30 min a 37°C con el segundo anticuerpo. Nuevamente, los preparados fueron lavados y luego montados en glicerol 90%. Se examinaron en un microscopio de fluorescencia y registramos el porcentaje de espermatozoides que mostró tinción específica.

Se obtuvieron microfotografías en un sistema confocal Bio-Rad-MRC-600 y se imprimieron las imágenes en una impresora Tektronic Phaser II<sup>sd</sup>.

## **6. CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LA NO-SINTASA ESPERMATICA POR WESTERN BLOT**

### **6.1. Solubilización de proteínas espermáticas murinas**

Los espermatozoides (10<sup>8</sup> células/ml) provenientes del epididimo caudal de ratón se colocaron en buffer fosfato salino (PBS, pH=7.4) a 37°C y se lavaron 5 min a 700 x g. El precipitado fue solubilizado en 200 µl de Tris-HCl 0.0625 M, pH=6.8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%, glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol (ABF) 0.01% (buffer muestra) en presencia de los siguientes inhibidores: 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de

inhibidor de tripsina y 1.0 mM de fenilmetilsulfonil-fluoruro (PMSF). Las muestras se hirvieron durante 5 min, se centrifugaron en centrífuga Eppendorf a 12000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. Una alícuota se utilizó para medir proteínas (Lowry *y col.* 1951) y el resto del sobrenadante se llevó a -70°C hasta el momento de la electroforesis. En algunos experimentos, las muestras se sembraron en presencia de 2-mercapto-etanol ( $\beta$ ME) al 1%.

## **6.2. Solubilización de proteínas de cerebro y cerebelo de rata**

Paralelamente se solubilizaron proteínas de corteza cerebral de rata, las cuales se utilizaron como control positivo de la presencia de la enzima NO-sintasa (Springall *y col.* 1992). El cerebro y cerebelo obtenidos de ratas macho albinas de la cepa Wistar cuyos pesos oscilaban entre 250-300 g, fueron aislados y suspendidos a 4°C en buffer A (sucrosa 0.25 M, Tris-HCl 20 mM, pH=7.4 y distintos inhibidores de proteasas antes citados) en una relación de un cerebro ó cerebelo (200 mg) : 0.5 ml de buffer A. A continuación, los tejidos se homogeneizaron y el homogenato obtenido se centrifugó a 7800 x g durante 10 min. Una alícuota del sobrenadante resultante se utilizó para medir proteínas (Lowry *y col.* 1951) y el resto del sobrenadante se llevó a -70°C hasta el momento de la electroforesis. En todos los experimentos, las muestras se sembraron en presencia de 2-mercapto-etanol al 1%.

## **6.3. Análisis por Western Blot**

Los extractos de proteínas solubilizadas de espermatozoides murinos, de cerebro y de cerebelo de rata fueron sometidos a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras. Se sembró 150  $\mu$ g de proteína por carril.

La composición de las soluciones y las condiciones experimentales empleadas durante el proceso electroforético fueron similares a las propuestas por Laemmli en su trabajo original (Laemmli, 1970), con algunas modificaciones, a saber:

### *a) Dispositivos utilizados:*

El procedimiento fue llevado a cabo mediante un sistema de electroforesis vertical (LKB 2001), utilizando geles discontinuos planos de 1.5 mm de espesor, preparados entre placas de vidrio (16 x 18 cm), empleando un gel separador (26 ml) y un gel stacking (9 ml). Cada gel constaba de 10 carriles, siendo el máximo volumen de muestra a sembrar por carril de 150  $\mu$ l.

*b) Composición de las soluciones:*

- Solución del gel Stacking: acrilamida/bisacrilamida (30:0.8), 3.75% T; Tris-HCl 0.125 M, pH=6.8; persulfato de amonio 0.075%; TEMED 0.075% (v/v).
- Solución del gel separador: acrilamida/bisacrilamida (30:0.8), 7.5% T; Tris-HCl 0.375 M, pH=8.8; persulfato de amonio 0.075%; TEMED 0.075% (v/v).
- Solución de los reservorios: Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, pH=8.3.
- Solución "buffer muestra": Tris-HCl 0.0625 M, pH=6.8; SDS 1%; glicerol 10% (v/v) y ABF 0.01%.

**Nota:** Todas las soluciones fueron preparadas utilizando agua bidestilada como disolvente.

*c) Condiciones experimentales:*

- Temperatura de trabajo: 10°C.
- Intensidad de corriente: 40 mA para el gel stacking y 60 mA para 1 gel separador.
- Voltaje: variable.
- Tiempo experimental: 2-3 hs.

Una vez concluido el proceso electroforético, los geles fueron analizados mediante la técnica de Western Blot descrita por Towbin y col. (Towbin y col. 1979) con algunas modificaciones.

Las proteínas fraccionadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) (0.45 µm) utilizando un sistema de transferencia que opera en medio semiseco (Multiphor II NovaBlot- LKB).

La solución buffer de transferencia estaba compuesta por Tris 0.048 M, glicina 0.039 M, SDS 0.035%, metanol 20% (v/v) y agua bidestilada como disolvente.

El proceso se llevó a cabo en las siguientes condiciones experimentales:

- Temperatura: 25°C.
- Intensidad de corriente: 0.8 mA/cm<sup>2</sup> de gel a transferir.
- Tiempo de transferencia: 1.5-2 hs.

Una vez concluida la transferencia, la membrana de NC fue incubada durante 1 min, a temperatura ambiente y con agitación, con una solución del colorante Ponceau S (ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo)fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico), cuya composición

fue: Ponceau S 0.2%, ácido tricloroacético 3% y ácido sulfosalicílico 3%, en agua bidestilada.

Una vez identificadas las diferentes calles, se decoloró totalmente la NC mediante un extensivo lavado con agua bidestilada y se cortaron las calles para separar los carriles correspondientes a las distintas muestras. Uno de ellos correspondió a una mezcla de proteínas marcadoras de peso molecular relativo ( $M_R$ ) para SDS-PAGE, compuesta por: miosina (215kD)  $\beta$ -galactosidasa (137 kD), BSA (71 kD), anhidrasa carbónica (43 kD), inhibidor de tripsina (31 kD), lisozima (17.9 kD) y aprotinina (7.9 kD). Esta muestra fue tratada con buffer muestra en las mismas condiciones utilizadas para las demás muestras, antes de ser incluídas en el gel. Se caracterizó cada banda por su valor de relación de frentes ( $R_f$ ) correspondiente, siendo:

$$R_f = \frac{\text{Distancia (cm) recorrida por la proteína en cuestión}}{\text{Distancia (cm) recorrida por ABF}}$$

Conociendo el valor de  $M_R$  de cada proteína patrón se construyó el gráfico ( $R_f$  vs.  $\log M_R$ ) correspondiente.

Las membranas de NC correspondientes a las proteínas de espermatozoides y de corteza cerebral fueron incubadas durante 18-22 hs a 4°C con solución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM, pH=7.5; NaCl 150 mM; Tween 20 0.05% (v/v) y BSA 1%). Esta incubación fue realizada con el propósito de evitar la adsorción inespecífica de los reactivos inmunológicos a la NC.

Posteriormente las membranas de NC fueron incubadas durante 2 hs a temperatura ambiente con diluciones 1:2000 del primer anticuerpo: IgGs anti-NOS neuronal, anti-NOS endotelial ó anti-NOS inducible preparadas en conejo, cuyas especificidades habían sido previamente demostradas (Springall y col. 1992). Estos antisueros son identificados como NOS-B, NOS-E y NOS-I respectivamente y provienen de RPMS/Wellcome (Beckenham, Kent, Reino Unido).

Luego de tres lavados con TBST (Tris-HCl 50 mM, pH=7.5; NaCl 150 mM; Tween 20 0.05% (v/v)), las membranas de NC fueron incubadas a temperatura ambiente, durante 1 h con una dilución 1:4000 de fosfatasa alcalina (Sigma Chem.Co.) en solución TBST. Luego de otra serie de lavados, esta vez con solución TBS (Tris-HCl 50 mM, pH=7.5; NaCl 150 mM) las membranas fueron embebidas con una mezcla de sustratos cromógenos compuesta por azul de p-nitrotetrazolio (NBT) 0.33 mg/ml y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 0.16 mg/ml en una relación molar 1:1, (preparada en solución Sustrato (Tris-HCl 100 mM, pH=9.5;

NaCl 100 mM;  $MgCl_2$  50 mM), durante 15-30 min, a temperatura ambiente y bajo oscuridad. Finalmente, las membranas fueron lavadas abundantemente con agua corriente.

Una vez concluido el ensayo se analizaron las bandas obtenidas, asignando a cada una su  $M_R$ .

## **7. CONVERSION DE L-[ $^{14}C$ ] ARGININA A L-[ $^{14}C$ ]CITRULINA Y PRODUCCION DE OXIDO NITRICO POR EL ESPERMATOZOIDE**

Se determinó la formación de NO en espermatozoides maduros de ratón mediante la conversión de L-[ $^{14}C$ ]arginina a L-[ $^{14}C$ ]citrulina según la técnica descripta por Bredt y Snyder (1989).

Con el fin de detectar la formación de NO, primeramente se realizó una curva de formación de producto en función del tiempo. Los espermatozoides ( $3-5 \times 10^7$  células/ml) se incubaron en 500  $\mu$ l de MF durante 0, 20, 60, 120 ó 180 min de incubación, a 37°C, con 5%  $CO_2$  en aire y en presencia de 5.0  $\mu$ M de L-[ $^{14}C$ ]arginina.

En los experimentos siguientes, el tiempo de incubación ensayado fue de 120-150 min a fin de trabajar con espermatozoides capacitados. Diferentes concentraciones de L-NAME ó aminoguanidina se adicionaron 30 min antes del agregado de 5.0  $\mu$ M de L-[ $^{14}C$ ]arginina para que ocurra la inhibición. Luego, la incubación continuó durante otros 120 min.

Seguidamente, se realizó una curva de formación de producto en función de la concentración de sustrato presente en el medio de incubación. Los espermatozoides se incubaron durante 120 min, en MF adicionado con concentraciones crecientes de L-arginina (5.0  $\mu$ M-35.0  $\mu$ M de L-[ $^{14}C$ ]arginina) agregadas al comienzo de la incubación.

Finalmente, con el propósito de demostrar que la progesterona estimula la producción de NO, los espermatozoides se incubaron en MF adicionado con 5.0  $\mu$ M de L-[ $^{14}C$ ]arginina y al cabo de los 90 min se agregó 15  $\mu$ M de progesterona durante 15 min más.

En todos los experimentos, la reacción se detuvo con tres ciclos de congelado y descongelado, las muestras se centrifugaron 10 min a 8000 x g. Las alícuotas (200  $\mu$ l) de los sobrenadantes se mezclaron con 2 ml de 20 mM buffer Hepes-NaOH, pH=7.4 y fueron aplicadas a columnas cromatográficas con 2  $cm^3$  de resina Dowex AG50WX8 (forma sódica). Las columnas se lavaron con 2 ml de agua deionizada y el volumen final (4 ml) fue fraccionado en cuatro viales. Cada vial se mezcló con 10 ml de líquido de centelleo y se midió la radiactividad.

La formación de L-[ $^{14}\text{C}$ ]citrulina en cada muestra se expresó en "picomoles de L-[ $^{14}\text{C}$ ]citrulina/ $10^7$  células". Como la formación de L-citrulina es estequiométrica con la formación de NO, se pudo asumir que una igual proporción de NO se había formado. Las variaciones intra y entre ensayos fueron menores al 10%.

## 8. DETERMINACION DE LA SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS E HIDROXIACIDOS ESPERMATICOS

La técnica de radioconversión del [ $^{14}\text{C}$ ]ácido araquidónico permite evaluar la capacidad de síntesis de prostaglandinas e hidroxiácidos a partir del agregado de ácido araquidónico exógeno.

El contenido de dos epidídimos caudales de machos adultos ( $6\text{-}9 \times 10^7$  células/ml) se incubó en 1 ml de MF adicionado con 3% de BSA bajo atmósfera gaseada a  $37^\circ\text{C}$  durante 60 min, en ausencia (control) ó presencia de distintas drogas.

Luego, las muestras se transfirieron a tubos cónicos de plástico de 5 ml (Corning), se agregó 0.25  $\mu\text{Ci}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]ácido araquidónico (52.9 Ci/mol; 1 Ci=37 GBq) (New England Nuclear) y se incubó durante otros 60 min en un baño termostatzado tipo Dubnoff bajo atmósfera de carbógeno (95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ ) a  $37^\circ\text{C}$ .

Finalizada la incubación, los productos derivados de la lipoxigenasa se extrajeron tres veces con 2 ml de acetato de etilo. Los extractos obtenidos se secaron con  $\text{N}_2$ , los residuos se resuspendieron en 0.2 ml de cloroformo:metanol (2:1 v/v) y se sembraron en placa de sílica gel (cromatografía en capa delgada) a fin de separar los metabolitos derivados de la lipoxigenasa formados durante la incubación. Paralelamente, se sembró el ácido 5-hidroxi-5,8,11,14-eicosatetraenoico (5-HETE) (Paesel, Frankfurt) como testigo. La corrida se realizó en cuba cromatográfica conteniendo una mezcla de solventes, a saber: acetato de etilo:isooctano:ácido acético:agua (76:67:20:100 v/v). Una vez corrida la placa y evaporado el solvente, el testigo se reveló con vapor iodado. Los  $R_f$  obtenidos para el ácido araquidónico y el 5-HETE fueron 0.85 y 0.70 respectivamente. La placa se cortó en segmentos de 1 cm aproximadamente, se colocaron en viales y se les agregó 10 ml de líquido de centelleo. La radioactividad presente se determinó a las 24 hs siguientes en un contador de centelleo líquido LKB1214 Rackbeta. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de conversión de radioactividad total de la placa (% cpm en la placa).



Finalizada la extracción de los productos de la lipoxigenasa y a fin de extraer los productos derivados de la ciclooxygenasa, el medio de incubación remanente se acidificó con HCl 0.01 M hasta obtener un pH=3.0. Se agregó un volumen de acetato de etilo y se dejó en contacto a 4°C durante 18-22 hs. Cumplido este período, se extrajo la fase de arriba y se realizaron dos extracciones más con igual volumen de acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se llevaron a sequedad bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Los residuos de las muestras fueron eluidos con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1 v/v) y se sembraron en placas mediante tubos capilares. Paralelamente, se sembraron testigos auténticos de PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> y TXB<sub>2</sub> (Sigma Chem.Co.). La corrida se realizó en una cuba cromatográfica con 200 ml aproximadamente de una mezcla de solventes: benceno : dioxano: ácido acético glacial (60:30:3 v/v). La posición de los testigos en la placa seca se visualizó con ácido fosfomolibdico (Sigma Chem.Co.) en etanol al 10% (p/v), seguido de calentamiento a 110°C durante 10 min. Los valores de R<sub>f</sub> obtenidos fueron: 0.47 para PGE<sub>2</sub>, 0.35 para PGF<sub>2α</sub>, 0.22 para 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>, 0.57 para TXB<sub>2</sub> y 0.80 para el ácido araquidónico. La placa se cortó en segmentos de 1 cm aproximadamente, se colocaron en viales y se les agregó 10 ml de líquido de centelleo. La radioactividad presente se determinó a las 24 hs siguientes en un contador de centelleo líquido LKB1214 Rackbeta. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de conversión de radioactividad total de la placa.

## 9. DROGAS UTILIZADAS

Los agentes farmacológicos que se emplearon en los ensayos *in vitro* fueron los siguientes:

- aminoguanidina (Sigma Chem.Co.).
- D-arginina (Sigma Chem.Co.).
- L-arginina (Sigma Chem.Co.).
- hemoglobina (Sigma Chem.Co.).
- ionóforo de calcio A23187 (Sigma Chem.Co.).
- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (NO<sub>2</sub>-arg) (Sigma Chem.Co.).
- N<sup>G</sup>-nitro-D-arginina-metil éster (D-NAME) (Sigma Chem.Co.).
- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) (Research Biochemical Products: RBI).
- nitroprusiato de sodio (Sigma Chem.Co.).

- spermine-NONOate (Cayman Chem. Co.).
- progesterona (Sigma Chem.Co.).
- seroalbúmina bovina, fracción V, para embriones (Sigma Chem.Co.).

En todos los casos se utilizaron las drogas en forma pura y las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de su empleo, con excepción del compuesto spermine-NONOate, el cual debió prepararse 1 h antes de ser utilizado de acuerdo a su cinética de reacción.

## 10. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Para las comparaciones estadísticas entre dos tratamientos se utilizó la prueba "t" de Student para muestras no apareadas. En aquellos casos en que se compararon en forma conjunta tres o más tratamientos se realizó en primer término un análisis de la varianza y luego se desarrolló un procedimiento de comparaciones múltiples por medio de la prueba de Student-Neuman-Keuls. Para el análisis de distribución de frecuencias entre grupos se aplicaron pruebas de  $\chi^2$  de independencia. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ . Cada experimento o ensayo representa una muestra espermática proveniente de un epidídimo caudal de ratón.

## **CAPITULO III**

### **Resultados**

## 1. EFECTO DEL OXIDO NITRICO EN LA MOTILIDAD ESPERMATICA MURINA

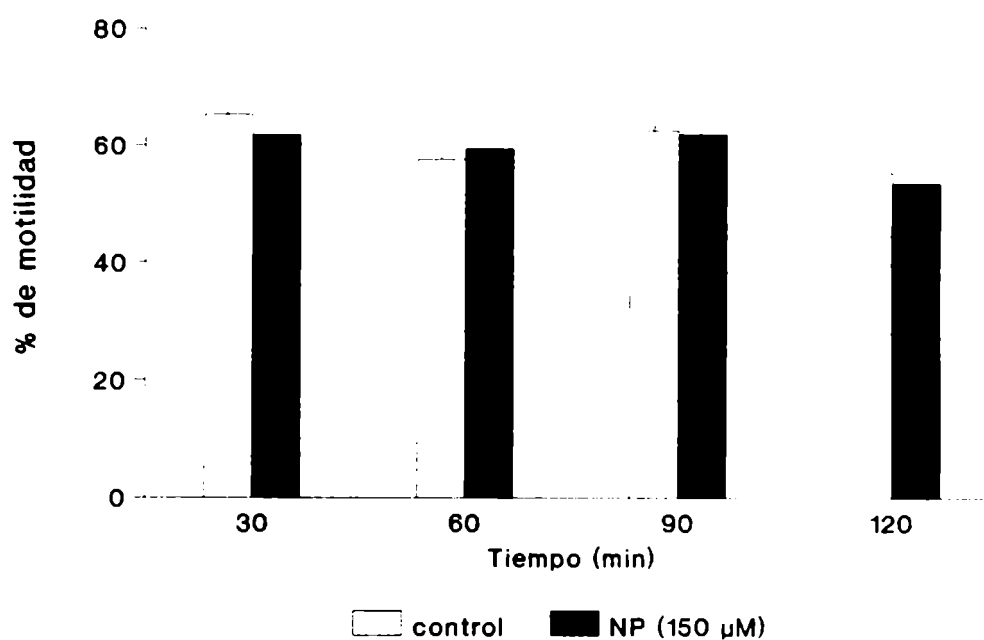
Estudios realizados en nuestro laboratorio, demostraban que el útero y el oviducto de ratas estrogenizadas eran capaces de sintetizar óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina como sustrato (Franchi y col. 1994; Perez Martinez y col. 1996). En base a estos datos, nos cuestionamos si el NO exógeno (proveniente quizás, del tracto genital femenino) podía modular la función de la gameta masculina durante el proceso de fertilización. Para ello, incubamos los espermatozoides en presencia de un generador de NO como es el nitroprusiato de sodio (NP) y medimos su efecto sobre el parámetro de motilidad espermática durante el periodo de capacitación *in vitro*.

### 1.1. Motilidad general en presencia de nitroprusiato de sodio

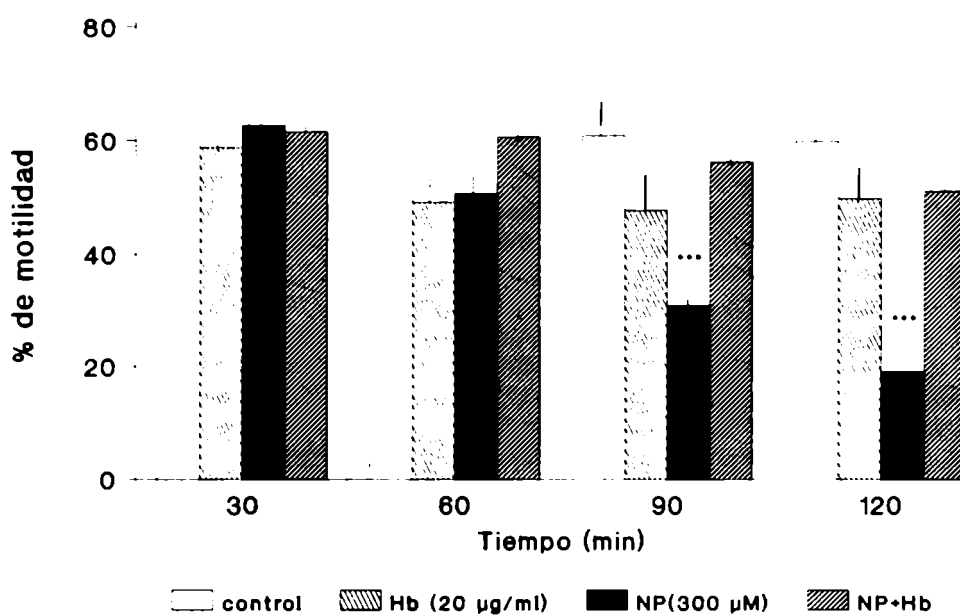
Cuando los espermatozoides murinos se incubaron durante 120 min (tiempo de capacitación) en un medio capacitante (MF), la motilidad (medida como porcentaje de espermatozoides móviles) permaneció constante a lo largo del tiempo. Cuando al medio de capacitación se adicionó 150  $\mu\text{M}$  de NP al comienzo de la incubación, la motilidad general no presentó diferencias significativas con respecto al control (*Figura III.1*). Sin embargo, cuando se agregó 300  $\mu\text{M}$  de NP al comienzo de la capacitación, el porcentaje de células móviles disminuyó significativamente comparado con el control a los 90 y 120 min de comenzada la incubación (*Figura III.2*).

A fin de comprobar que el efecto observado con 300  $\mu\text{M}$  de NP sobre la motilidad se debió específicamente al NO, se incubaron los espermatozoides en presencia de hemoglobina (Hb), la cual actúa como atrapador del NO. Así, el porcentaje de motilidad observado en presencia de hemoglobina (20  $\mu\text{g/ml}$ ) adicionada a tiempo 0 de incubación con y sin NP fue semejante al del control (*Figura III.2*).

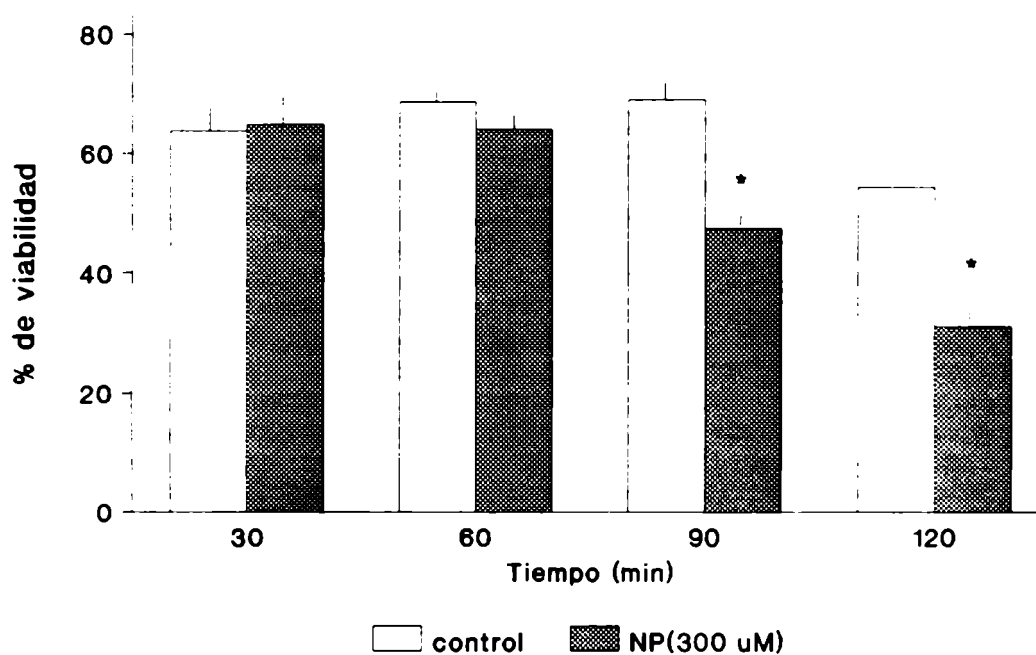
Habiendo determinado que el efecto observado con 300  $\mu\text{M}$  de NP se debió al NO, nos cuestionamos el por qué de la disminución de la motilidad observada en la *Figura III.2*, ya que los espermatozoides inmóviles podían estar vivos pero quiescentes ó muertos. Así, la *Figura III.3* muestra que la disminución de la motilidad en presencia de 300  $\mu\text{M}$  de NP es causada por la pérdida de viabilidad de los espermatozoides.



**Figura III.1: Efecto del nitroprusiato de sodio (NP) en la motilidad espermática durante la capacitación *in vitro*. Los espermatozoides provenientes del epidídimo caudal de ratón se incubaron en MF en ausencia ó presencia de 150  $\mu$ M de un generador de NO (NP) durante 120 min. A distintos tiempos se registró la motilidad basal (expresada como porcentaje de motilidad). No existieron diferencias significativas entre ambos grupos. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 8 experimentos.**



**Figura III.2: Efecto del NP en la motilidad espermática durante la capacitación *in vitro*.** Los espermatozoides se incubaron en MF en presencia de NP (300 µM), Hb (20 µg/ml) ó Hb (20 µg/ml)+NP (300 µM) durante 120 min. A distintos tiempos se registró la motilidad basal. El tratamiento con NP disminuyó significativamente el porcentaje de células móviles a los 90 y 120 min comparado con los otros grupos. Los tratamientos con NP+Hb y con Hb no difieren significativamente del control. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 8 experimentos. (\*\*):  $P < 0.001$ .



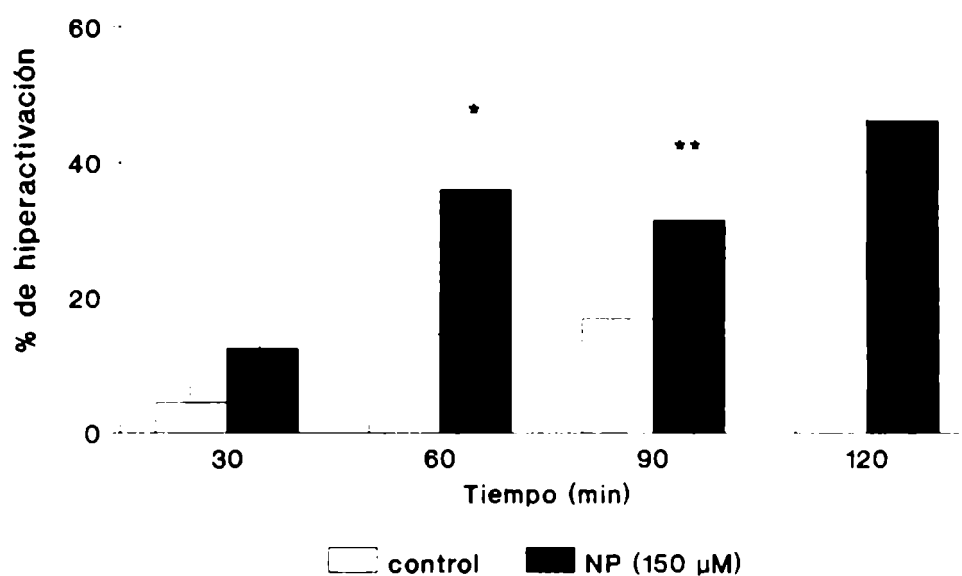
**Figura III.3: Efecto del NP sobre la viabilidad espermática.** Los espermatozoides se incubaron en MF en ausencia ó presencia de 300  $\mu$ M de NP y a distintos tiempos se evaluó la viabilidad espermática mediante la tinción con eosina al 5%. El tratamiento con NP disminuyó significativamente el número de espermatozoides vivos a los 90 y 120 min de incubación comparado con el control. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos. (\*):  $P < 0.05$ .

## 1.2. Hiperactivación con nitroprusiato de sodio

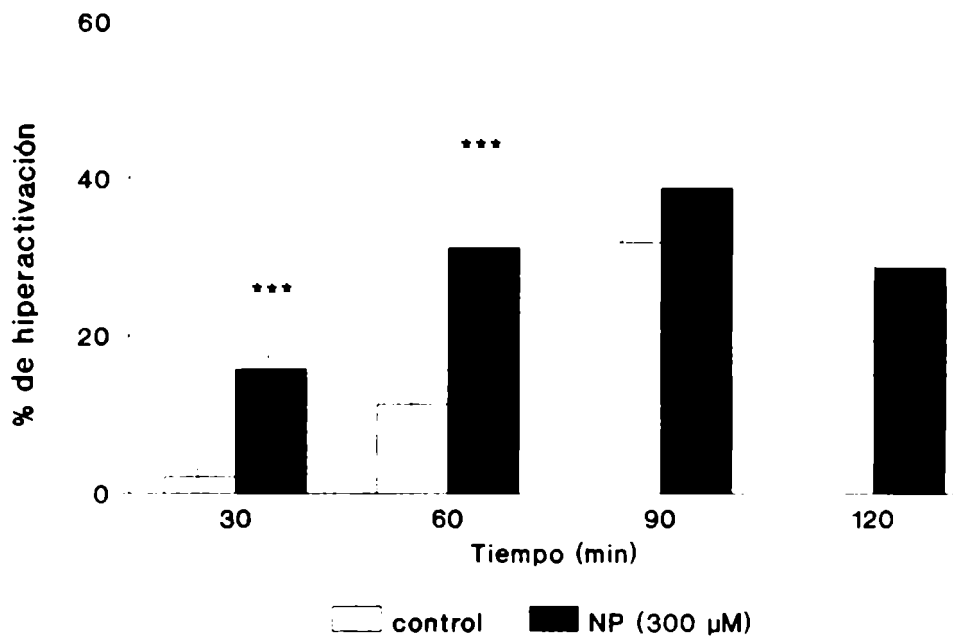
Otro patrón de motilidad medible es el de hiperactivación espermática. La hiperactivación se caracteriza por el movimiento en forma de látigo del flagelo y movimiento no progresivo matizado con pequeños episodios de movimiento lineal. Cuando incubamos los espermatozoides en presencia de 150  $\mu\text{M}$  de NP desde el comienzo de la capacitación, el porcentaje de espermatozoides con patrón de motilidad hiperactivado aumentó significativamente con respecto al control durante los 60 y 90 min de incubación (*Figura III.4*). Asimismo, el agregado de una concentración mayor de NP (300  $\mu\text{M}$ ) produjo un aumento significativo a los 30 y 60 min de comenzada la incubación (*Figura III.5*).

Estos resultados muestran que en presencia de NP el patrón de hiperactivación se ve acelerado en el tiempo comparado con el control. Así, una mayor concentración de NP resulta en un mayor adelanto en el tiempo del patrón de hiperactivación espermática.





**Figura III.4: Efecto del NP sobre la hiperactivación espermática.** Los espermatozoides se incubaron en MF en ausencia ó presencia de 150  $\mu$ M de NP y a distintos tiempos se evaluó el porcentaje de células hiperactivadas. El tratamiento con NP aumentó significativamente el porcentaje de hiperactivación a los 60 y 90 min comparado con el control. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 8 experimentos. (\*):  $P < 0.05$ ; (\*\*):  $P < 0.01$ .



**Figura III.5: Efecto del NP sobre la hiperactivación espermática.** Los espermatozoides se incubaron en MF en ausencia ó presencia de 300 µM de NP y a distintos tiempos se evaluó el porcentaje de células hiperactivadas. El tratamiento con NP aumentó significativamente el porcentaje de hiperactivación a los 30 y 60 min comparado con el control. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 8 experimentos. (\*\*\*):  $P < 0.001$ .

## **2. EVIDENCIAS FARMACOLOGICAS DE LA PRESENCIA DE LA ENZIMA NO-SINTASA EN EL ESPERMATOZOIDE MURINO**

Dado que el NO exógeno estimula la motilidad espermática, nos interesó investigar la presencia de la enzima NO-sintasa en la gameta masculina y su posible participación en el proceso de fertilización. Para este fin, primeramente se realizaron ensayos farmacológicos, los cuales están descriptos a continuación y seguidamente estos ensayos se complementaron con técnicas inmunológicas y bioquímicas.

### **2.1. PARTICIPACION DE LA NO-SINTASA ESPERMATICA EN LA FERTILIZACION *IN VITRO***

#### **2.1.1. Efecto de inhibidores de la óxido nítrico sintasa en la fertilización**

Con el fin de conocer si la gameta masculina posee la enzima responsable de la síntesis de NO (NO-sintasa), se investigó el efecto de diferentes inhibidores de la NO-sintasa sobre la fertilización *in vitro* murina.

La *Tabla III.1* muestra el efecto de tres inhibidores: NO<sub>2</sub>-arg, L-NAME y aminoguanidina adicionados al comienzo de la capacitación espermática. Los porcentajes de fertilización en el grupo control varían entre 71% y 96% (media: 84.4%) y la variación interensayo es del 10.3%.

En presencia de L-NAME como de NO<sub>2</sub>-arg el porcentaje de fertilización (embriones en estadio de dos pronúcleos) fue significativamente menor comparado con el control. A las 8 hs post-inseminación, se observó que los ovocitos no fertilizados tenían espermatozoides móviles adheridos a la zona pelúcida. Esto estaría indicando que algunos de los mecanismos de la función espermática involucrados en la fertilización (hiperactivación y/o reacción acrosomal) están afectados en presencia de L-NAME y de NO<sub>2</sub>-arg, ya que los espermatozoides llegan hasta el ovocito pero no son capaces de atravesar la zona pelúcida.

Por otro lado, 0.5 mM de aminoguanidina, que inhibe específicamente la NO-sintasa inducible (isoforma II) (Misko y *col.* 1993) no tuvo efecto sobre el porcentaje de ovocitos fertilizados *in vitro*.

Tratamiento	Experimentos (n)	Ovocitos (n)	Fertilización (%)	Significación estadística
Control	4	70	87,1	
L-NAME (1mM)	4	40	17,5	P< 0.001
NO <sub>2</sub> -arg (0,6mM)	4	47	61,7	P< 0.005
Aminoguanidina (0,5mM)	4	41	82.9	n.s.

**Tabla III.1: Efecto de distintos inhibidores de la NO-sintasa sobre la fertilización *in vitro* en ratón. Los espermatozoides se incubaron en MF durante 120 min en presencia de L-NAME (1 mM), NO<sub>2</sub>-arg (0.6 mM) ó aminoguanidina (0.5 mM). Al cabo de ese tiempo, los ovocitos se inseminaron con espermatozoides controles ó tratados. A las 8 hs post-inseminación se evaluó el porcentaje de embriones con dos pronúcleos (% de ovocitos fertilizados). (n): número de ovocitos y de experimentos, (n.s.): no significativo.**

### 2.1.2. Efecto de diferentes concentraciones de L-NAME en la fertilización *in vitro*

La *Tabla III.2* muestra el efecto de diferentes concentraciones de L-NAME (agregadas al comienzo de la incubación) sobre el porcentaje de ovocitos fertilizados. La inhibición fue dependiente de la concentración y se observó a todas las concentraciones utilizadas: 0.1 mM y 0.3 mM de L-NAME produjeron una inhibición de un 20% respecto al control, mientras que 0.6 mM y 1 mM de L-NAME redujeron claramente el porcentaje de embriones en estadio de dos pronúcleos (40% y 60% respectivamente). Entonces, a partir de la curva concentración-respuesta y considerando como efecto máximo el de 1 mM de L-NAME, resultó una concentración efectiva ( $CE_{50}$ ) de  $0.648 \pm 0.018$  mM. Por lo tanto, se eligió como concentración de trabajo: 0.6 mM de L-NAME.

### 2.1.3. Efecto del desplazamiento de L-NAME por L-arginina en la fertilización *in vitro*

Si los efectos observados con L-NAME se deben a una inhibición competitiva con la L-arginina por la enzima NO-sintasa, esta acción inhibitoria debe ser revertida por el sustrato L-arginina en altas concentraciones (Gray y col. 1991). Así, 2 mM de L-arginina revirtió levemente la inhibición producida por L-NAME; pero una concentración de 5 mM de L-arginina adicionada a 0.6 mM de L-NAME revirtió totalmente esta inhibición, es decir que no presentó diferencias significativas respecto del grupo control (*Tabla III.3*). Además, 5 mM de D-arginina no revirtió el efecto inhibitorio del L-NAME. Cabe aclarar que la adición de 5 mM de L- ó D-arginina durante la capacitación no produjo efecto alguno sobre la fertilización *in vitro*.

Por otro lado, el enantiómero inactivo del L-NAME, denominado D-NAME no inhibió el porcentaje de ovocitos fertilizados respecto al control (*Tabla III.3*).

En nuestro diseño experimental no descartamos la posibilidad que el inhibidor, presente en la suspensión de espermatozoides, sea transferido a la gota de fertilización y afecte a los ovocitos durante la fertilización. Si 15  $\mu$ l de la suspensión espermática conteniendo 0.6 mM de L-NAME se diluyen en un volumen final de 150  $\mu$ l en la gota de fertilización, entonces la concentración final de L-NAME será de 0.06 mM. Ambas gametas quedan expuestas durante las 8 hs de incubación a esta concentración del inhibidor. Por lo tanto, realizamos los siguientes controles experimentales: (1) los ovocitos se inseminaron con espermatozoides no tratados pero la gota de fertilización contenía 0.06 mM de L-NAME y (2) los ovocitos se incubaron 30 min con 0.6 mM de L-NAME, se lavaron tres veces y se inseminaron con espermatozoides no

Tratamiento	Experimentos (n)	Ovocitos (n)	Fertilización (%)	Significación estadística
Control	4	71	85,9	
L-NAME (1mM)	4	57	17,5	P<0.001
L-NAME (0,6mM)	4	40	52,5	P<0.005
L-NAME (0,3mM)	4	42	69,0	P<0.05
L-NAME (0,1mM)	4	46	67,4	P<0.05

**Tabla III.2: Efecto del L-NAME sobre la fertilización *in vitro* en ratón.** Los espermatozoides se incubaron en MF durante 120 min en presencia de distintas concentraciones de L-NAME. Al cabo de ese tiempo los ovocitos se inseminaron con espermatozoides controles ó tratados. A las 8 hs post-inseminación se evaluó el porcentaje de embriones con dos pronúcleos (% de ovocitos fertilizados). (n): número de ovocitos o de experimentos, n.s.: no significativo.

Tratamiento	Experimentos (n)	Ovocitos (n)	Fertilización (%)	Significación estadística
Control	3	37	91,9	
L-NAME (0,6mM)	3	59	35,6	P<0.001
D-NAME (0,6mM)	3	43	79,1	n.s.
L-NAME + L-Arginina (2mM)	3	48	58,5	P<0.01.
L-NAME + L-Arginina (5mM)	3	83	72,3	n.s.
L-NAME + D-Arginina (5mM)	3	32	40,6	P<0.001
L-Arginina (5mM)	3	42	81,0	n.s.
D-Arginina (5mM)	3	40	75,0	n.s.

**Tabla III.3: Efecto del D-NAME y de la reversión del efecto inhibitorio del L-NAME con L-y D-arginina sobre la fertilización *in vitro* en ratón.** Los espermatozoides se incubaron en MF durante 120 min en presencia de L-NAME, D-NAME, L- ó D-arginina . En otro grupo experimental, los espermatozoides se incubaron en MF con L- ó D-arginina adicionadas simultáneamente con L-NAME (0.6 mM) al comienzo de la capacitación. A las 8 hs post-inseminación se evaluó el porcentaje de embriones con dos pronúcleos (ovocitos fertilizados). (n): número de ovocitos o de experimentos. n.s.: no significativo.

tratados pero la gota de fertilización contenía 0.06 mM de L-NAME. Ambos tratamientos presentaron porcentajes de fertilización de 81% y 91% respectivamente, es decir que no se observó ningún efecto inhibitorio. Estos ensayos estarían indicando que el efecto inhibitorio del L-NAME en la fertilización se debió a un efecto específico sobre la gameta masculina durante el periodo de capacitación.

## **2.2. PARTICIPACION DE LA NO-SINTASA EN LA MOTILIDAD ESPERMATICA**

Los resultados presentados hasta aquí sugieren que alguno(s) de los mecanismos concernientes a la función espermática estaría(n) afectado(s), dado que el porcentaje de fertilización *in vitro* disminuye respecto al control cuando los espermatozoides son capacitados en presencia de diferentes inhibidores de la enzima NO-sintasa.

Con el fin de precisar cuál de los parámetros se encuentra afectado, primeramente medimos el efecto de L-NAME sobre la motilidad espermática murina.

### **2.2.1. Efecto de la inhibición de la NO-sintasa sobre la motilidad del espermatozoide**

Los espermatozoides se incubaron en un medio capacitante (BSA 3%) en presencia de 0.6 mM y 1 mM de L-NAME. En ambos casos, la motilidad general a los 120 min, disminuyó significativamente comparado con el control (*Figura III.6*).

En cuanto al patrón de hiperactivación, podemos observar en la *Figura III.6* que el porcentaje de espermatozoides hiperactivados a los 120 min fue significativamente menor en los grupos tratados con L-NAME que en el grupo control.

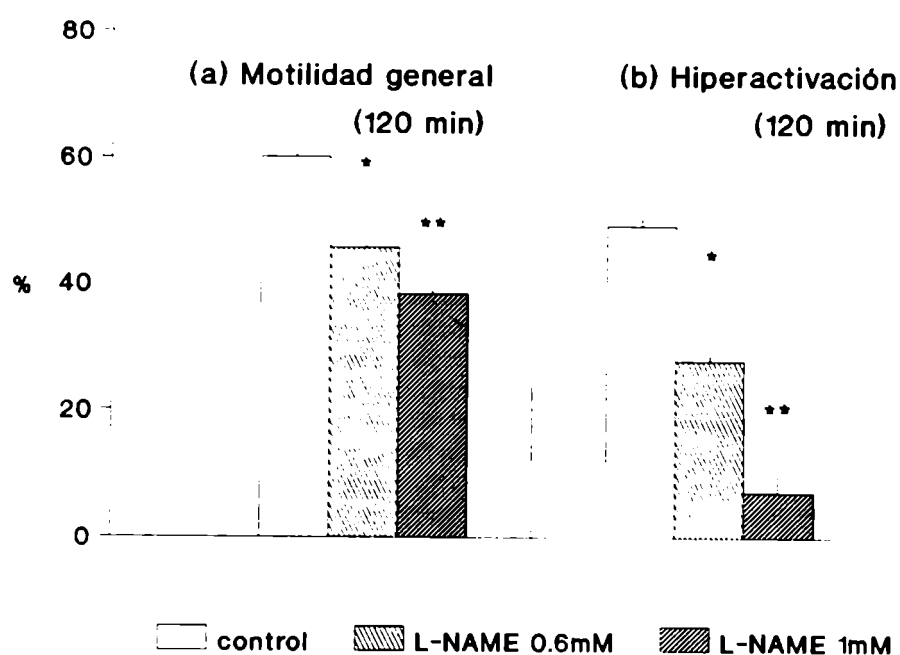
Por lo tanto, una posible explicación a la disminución observada con L-NAME en el porcentaje de fertilización sería entonces, que el mecanismo de hiperactivación, el cual favorece la penetración del espermatozoide por la zona pelúcida está inhibido.

## **2.3. LA NO-SINTASA ESPERMATICA PARTICIPARIA EN LA REACCION ACROSOMAL ESPONTANEA**

### **2.3.1. Perfil temporal de la reacción acrosomal espontánea**

Sabiendo que el patrón de hiperactivación estaba afectado en presencia de L-NAME, nos preguntamos si el otro parámetro medible como lo es la reacción acrosomal también estaba





**Figura III.6: Efecto del L-NAME sobre la motilidad y la hiperactivación espermática.** Se incubaron espermatozoides en presencia de 0.6 mM y 1 mM de L-NAME y se evaluó: (a) el porcentaje de espermatozoides móviles y (b) el porcentaje de espermatozoides hiperactivados a los tiempos indicados ( 120 min). Ambas concentraciones de L-NAME disminuyeron el porcentaje de motilidad y de hiperactivación a los 120 min comparado con el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos. (\*):  $P < 0.05$ ; (\*\*):  $P < 0.01$ .

afectado. Para ello incubamos a los espermatozoides en un medio capacitante durante 240 min. A los tiempos 0, 120, 180 y 240 se sacó una alícuota de la muestra y se midió el status acrosomal mediante la técnica HOS-SPERMAC, descrita en la sección II.4.

En la *Figura III.7* se observa que a los 180 y 240 min hubo un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente comparado con el tiempo 0 de incubación.

### **2.3.2. Efecto de la inhibición de la NO-sintasa en la reacción acrosomal espontánea**

#### **2.3.2.1. Efecto de diferentes concentraciones de L-NAME sobre la reacción acrosomal espontánea**

La *Figura III.8* muestra el efecto de 1 mM, 0.6 mM, 0.3 mM y 0.1 mM de L-NAME (adicionados al comienzo de la incubación) sobre el porcentaje de espermatozoides reaccionados en forma espontánea a los 240 min de comenzada la capacitación. La inhibición fue concentración-dependiente; sólo las concentraciones de 0.6 mM y 1 mM de L-NAME redujeron significativamente el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

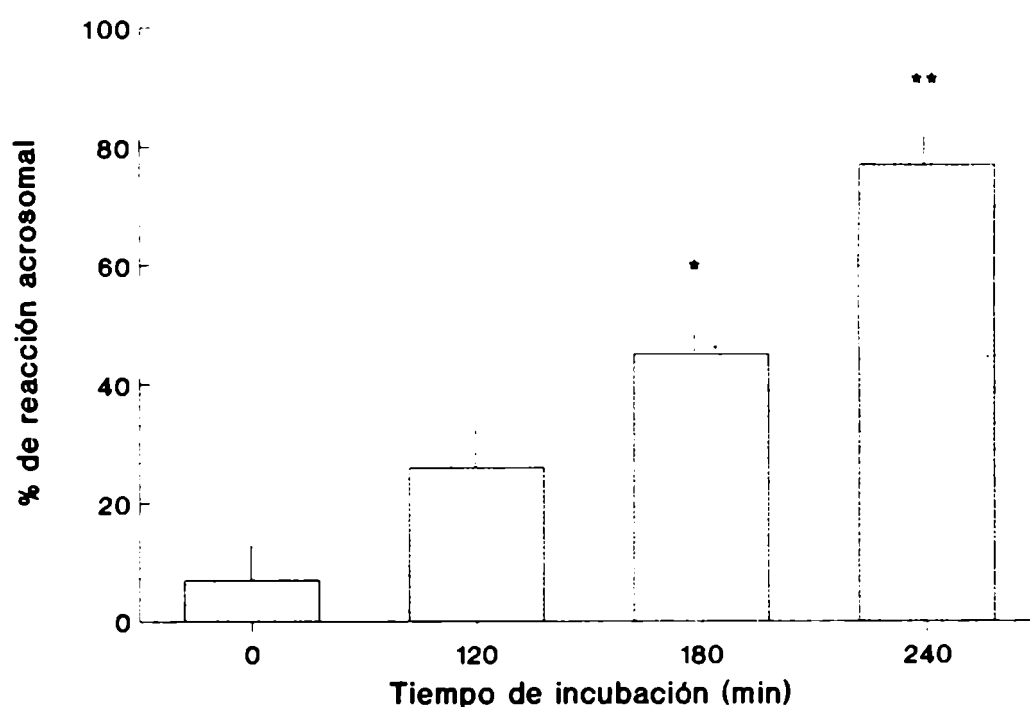
A partir de la curva concentración-respuesta y considerando como efecto máximo el de 1 mM, la concentración efectiva de trabajo fue:  $EC_{50} = 0.402 \pm 0.004$  mM. Nosotros utilizamos 0.6 mM de L-NAME como concentración de trabajo por ser la concentración más próxima a 0.4 mM con significancia estadística.

Por otro lado, la viabilidad espermática no se modificó con las concentraciones de L-NAME utilizadas y variaron entre 60-75% luego de los 240 min de incubación (*Figura III.9*).

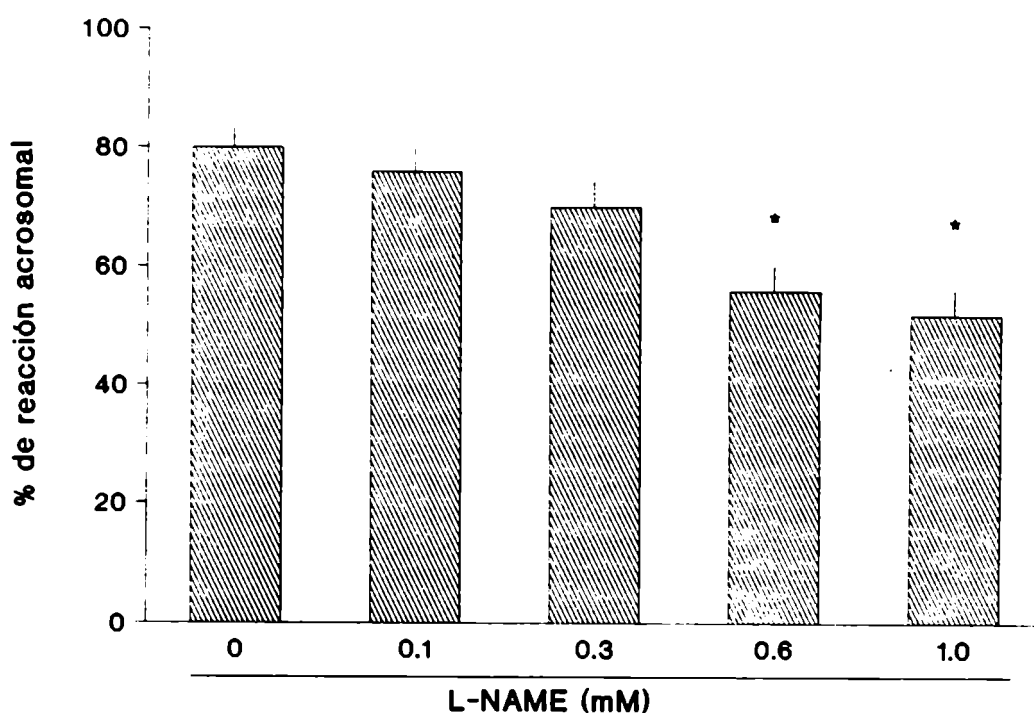
#### **2.3.2.2. Efecto del desplazamiento del L-NAME por L y D- arginina sobre la reacción acrosomal espontánea**

Cuando los espermatozoides fueron incubados en presencia de 0.6 mM de L-NAME el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente disminuyó significativamente respecto al control al cabo de 240 min. Sin embargo, este efecto inhibitorio no se observó cuando los espermatozoides fueron incubados en presencia del enantiómero inactivo D-NAME.

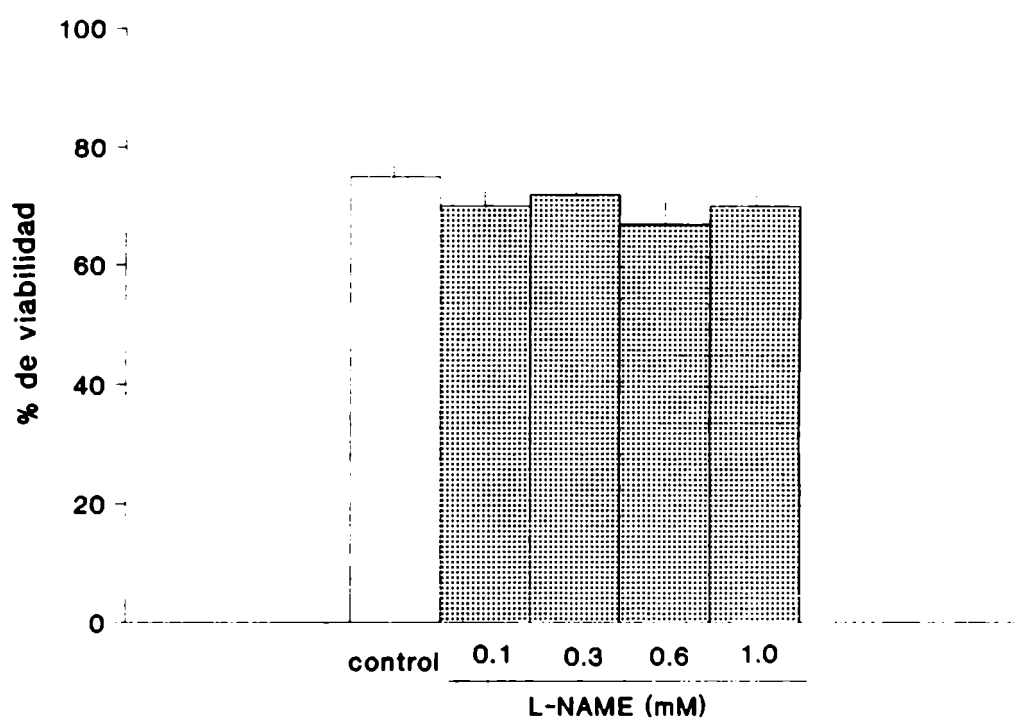
Además, la presencia de 5 mM de L-arginina en el medio de incubación con L-NAME, revirtió el efecto inhibitorio a valores semejantes de los del control. A diferencia de la



**Figura IIL7: Variación temporal de la reacción acrosomal espontánea en el ratón. Los espermatozoides se incubaron en MF y a los tiempos indicados (0, 60, 120, 180 y 240 min) se determinó el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente mediante la técnica HOS-Spermac. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos. (\*):  $P < 0.05$  (T=180 min vs. T=0); (\*\*):  $P < 0.01$  (T=240 vs. T=0).**



**Figura III.8:** Efecto de diferentes concentraciones de L-NAME en la reacción acrosomal espontánea. Se incubaron espermatozoides de ratón en MF con concentraciones crecientes de L-NAME adicionado al comienzo de la capacitación y se determinó el porcentaje de espermatozoides reaccionados a los 240 min mediante la tinción HOS-Spermac. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos. (\*):  $P < 0.05$  (0.6 mM vs. control) y (1 mM vs. control).



**Figura III.9: Efecto del L-NAME sobre la viabilidad espermática.** Se incubaron espermatozoides de ratón en MF con concentraciones crecientes de L-NAME adicionado al comienzo de la incubación y se determinó el porcentaje de espermatozoides viables a los 240 min por la técnica de HOS-Spermac. Las concentraciones de L-NAME ensayadas no modificaron significativamente el porcentaje de viabilidad respecto al control. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 4 experimentos.

L-arginina, el agregado de 5 mM de D-arginina al medio con 0.6 mM de L-NAME, no modificó los porcentajes de espermatozoides reaccionados obtenidos en presencia del inhibidor (*Tabla III.4*).

Estos ensayos corroboran el efecto específico del L-NAME sobre la NO-sintasa, la cual podría estar involucrada tanto en el proceso espontáneo de exocitosis espermática como en la capacitación.

#### **2.4. LA NO-SINTASA ESPERMATICA INTERVIENE EN LA REACCION ACROSOMAL INDUCIDA POR PROGESTERONA**

Varias son las sustancias descritas capaces de inducir la reacción acrosomal en el ratón. Basándonos en un trabajo de Roldán y *col.* (1994), utilizamos un inductor fisiológico de la reacción acrosomal como es la progesterona (P) y realizamos los siguientes ensayos experimentales. Los espermatozoides se incubaron en un medio capacitante durante 120 min y al cabo de ese tiempo se observó que el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente en el grupo control (vehículo) fue del 28% (*Figura III.10*). Sin embargo, cuando los espermatozoides capacitados se expusieron a 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M ó 20  $\mu$ M de progesterona durante 15 min, el porcentaje de células reaccionadas aumentó significativamente. La inducción fue concentración-dependiente y la máxima estimulación se obtuvo con 20  $\mu$ M de progesterona. Sin embargo, como no existieron diferencias significativas entre 15  $\mu$ M y 20  $\mu$ M, elegimos 15  $\mu$ M como concentración de trabajo (*Figura III.10*).

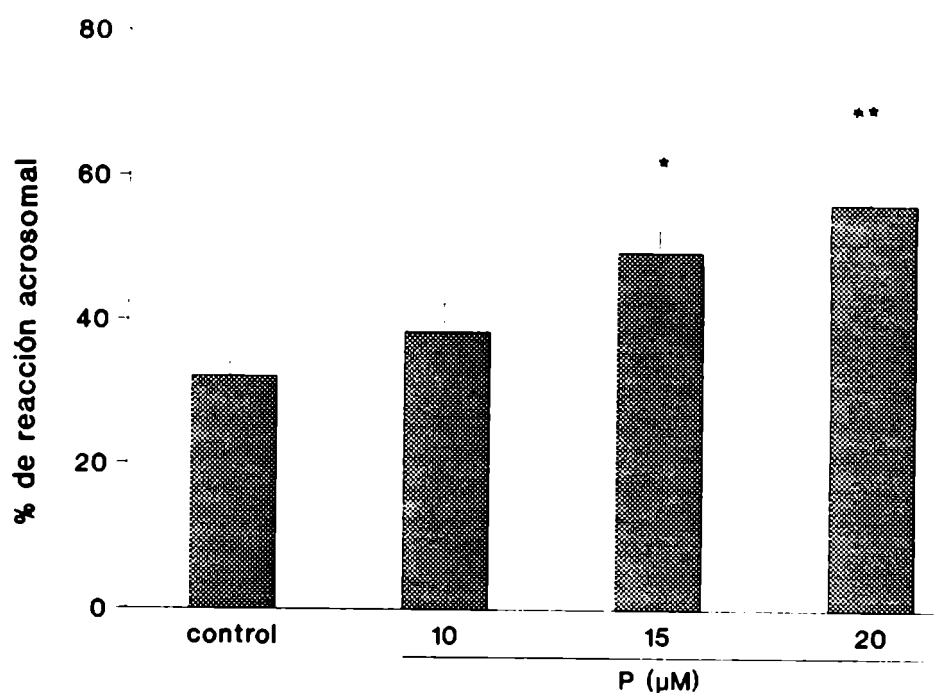
##### **2.4.1. Efecto de inhibidores de la NO-sintasa en la reacción acrosomal inducida por progesterona**

Con el fin de investigar la función del NO sintetizado por el espermatozoide en la reacción acrosomal inducida por progesterona, se estudió el efecto de L-NAME y NO<sub>2</sub>-arg adicionados al comienzo de la capacitación.

Cuando los espermatozoides se incubaron durante 120 min en presencia de 0.6 mM de L-NAME ó NO<sub>2</sub>-arg y luego se adicionó 15  $\mu$ M de progesterona durante 15 min, el porcentaje de espermatozoides reaccionados fue semejante al grupo control; es decir que los espermatozoides no fueron capaces de responder al estímulo de la progesterona en presencia de dos inhibidores de la enzima NO-sintasa. Además, el enantiómero inactivo D-NAME no tuvo

Tratamiento	% de reacción acrosomal		
	0 min	120 min	240 min
Control	7.1 ± 5.2	26.4 ± 4.6	87.7 ± 6.7
L-NAME (0,6mM)	8.2 ± 3.5	24.7 ± 5.3	50.7 ± 5.0*
D-NAME (0,6mM)	7.9 ± 3.2	25.8 ± 6.0	78.3 ± 5.5
L-NAME (0,6mM) + L-ARG (5mM)	6.3 ± 4.0	24.1 ± 6.1	77.2 ± 5.3
L-NAME (0.6mM) + D-ARG(5mM)	7.4 ± 5.1	26.1 ± 5.9	51.4 ± 7.1*
L-ARG(5mM)	7.3 ± 4.1	25.3 ± 5.2	82.5 ± 6.3
D-ARG(5mM)	7.3 ± 3.8	24.3 ± 5.7	79.9 ± 5.9

**Tabla III.4: Reversión del efecto inhibitorio del L-NAME con L- y D-arginina sobre la reacción acrosomal espontánea. Se incubaron espermatozoides de ratón en presencia de L-NAME, L-NAME+L-arginina, L-NAME+D-arginina, D-NAME, L-óD-arginina. A los tiempos indicados se determinó el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente por la tinción HOS-Spermac. Cada valor se indica como media ± S.E.M. de 5 experimentos. (\*): P< 0.01 (T=240 min vs. control).**



**Figura III.10:** Efecto de diferentes concentraciones de progesterona (P) sobre la reacción acrosomal de ratón. Los espermatozoides se capacitaron en MF durante 120 min y luego se expusieron a 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M ó 20  $\mu$ M de progesterona por otros 15 min. Al grupo control se le adicionó el vehículo (DMSO). Finalizada la incubación se determinó el porcentaje de espermatozoides reaccionados por la técnica HOS-Spermac. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos. (\*):  $P < 0.01$  y (\*\*):  $P < 0.001$  control vs. tratados; progesterona (15 $\mu$ M) vs. progesterona (20 $\mu$ M) es no significativo.



efecto sobre la reacción acrosomal inducida con 15  $\mu$ M de progesterona (*Figura III.11*).

Se sabe que en el ratón, el tiempo de capacitación es entre 90-120 min; sin embargo otros investigadores establecen que gran número de espermatozoides está capacitado a partir de los 60 min (Visconti y col. 1995).

En los experimentos antes descriptos, los inhibidores fueron agregados al comienzo de la capacitación; por lo tanto, los inhibidores podían estar afectando el proceso de capacitación, el de reacción acrosomal o ambos.

Para poder determinar cuál de los dos procesos estaba afectado en presencia de L-NAME ó NO<sub>2</sub>-arg, los espermatozoides se incubaron con 0.6 mM de L-NAME ó NO<sub>2</sub>-arg a diferentes tiempos durante la capacitación. Así, en un grupo, el inhibidor se adicionó a tiempo 60 de capacitación y en otro grupo a los 90 min de capacitación. En ambos casos, 15  $\mu$ M de progesterona se agregó a los 120 min de incubación durante otros 15 min.

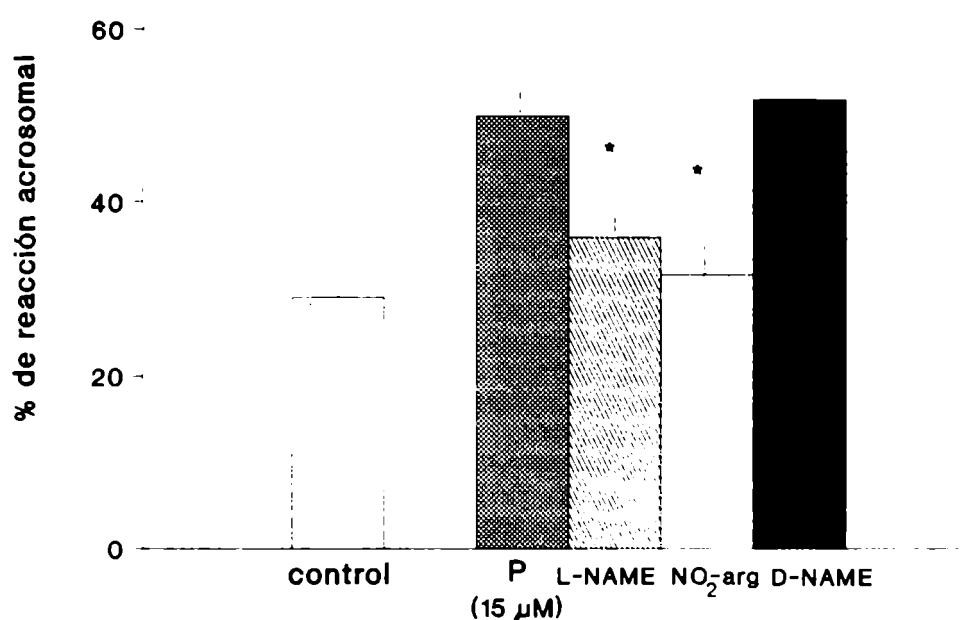
A los 60 min, el efecto de ambos inhibidores fue mayor que a los 90 min; sin embargo esta diferencia no fue significativa. Por lo tanto, L-NAME y NO<sub>2</sub>-arg redujeron el porcentaje de exocitosis estimulada por progesterona independientemente del tiempo en que fueron adicionados durante la capacitación (60 ó 90 min) (*Figura III.12*).

Estos resultados sugieren que la enzima NO-sintasa del espermatozoide participaría en el proceso de reacción acrosomal inducida por progesterona.

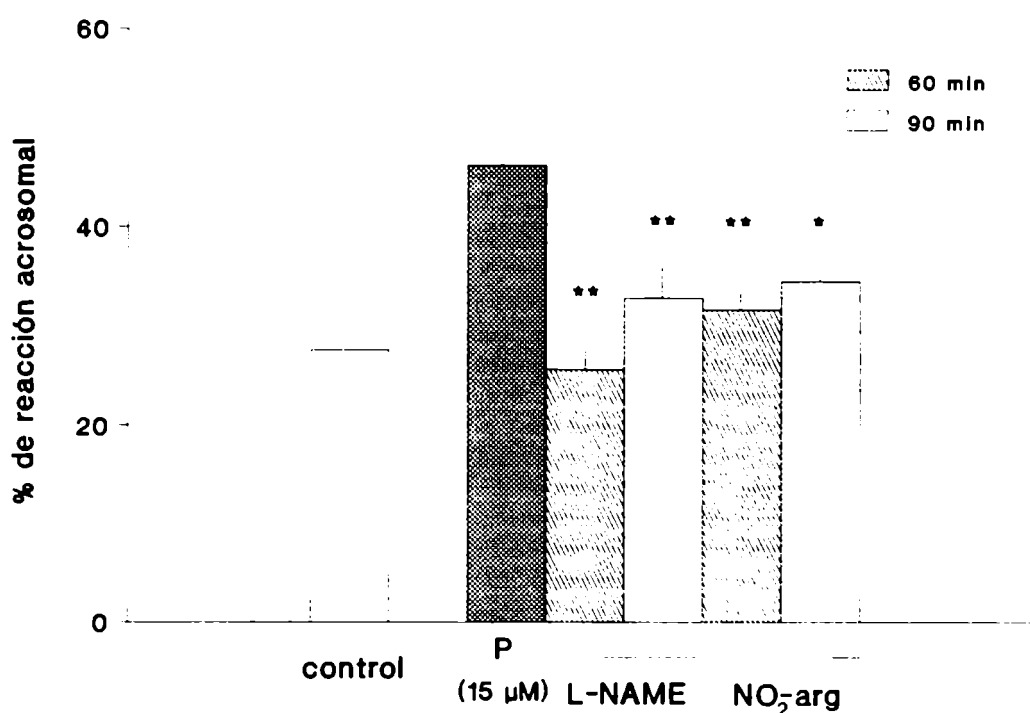
#### **2.4.2. El óxido nítrico estimula directamente la reacción acrosomal**

Los resultados anteriores evidencian que el NO sintetizado por el espermatozoide es necesario para que la progesterona pueda ejercer su efecto sobre la exocitosis. Entonces, si el NO es un mediador en la acción de la progesterona, puede ser que estimule directamente la reacción acrosomal. Por lo tanto, estudiamos el efecto de un generador de NO, llamado spermine-NONOate sobre la reacción acrosomal murina.

Cuando los espermatozoides se capacitaron durante 120 min y luego se expusieron durante 15 min adicionales a diferentes concentraciones de spermine-NONOate, el porcentaje de espermatozoides reaccionados aumentó respecto al control. Una concentración de 0.1 mM de spermine-NONOate produjo una máxima estimulación, mientras que 0.3 mM estimuló en menor proporción y 0.01 mM y 0.6 mM de spermine-NONOate no produjeron estimulación alguna. Es importante aclarar que el porcentaje de espermatozoides reaccionados con 0.1 mM



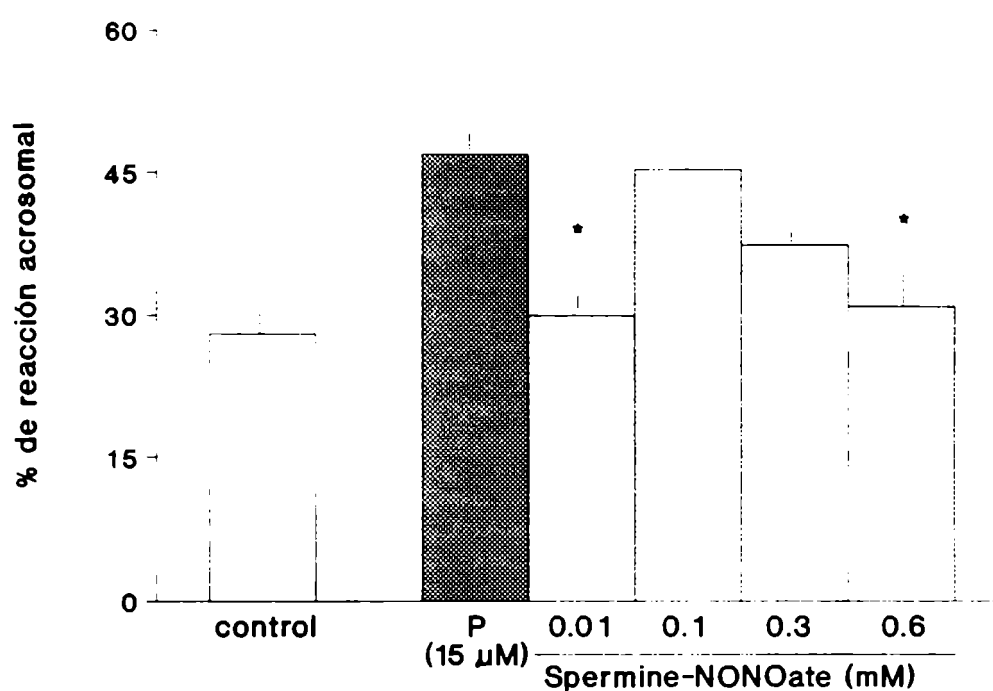
**Figura III.11:** Efecto de inhibidores de la NO-sintasa sobre la reacción inducida por progesterona. Los inhibidores L-NAME (0.6mM), D-NAME (0.6 mM) ó NO<sub>2</sub>-arg (0.6 mM) se adicionaron al comienzo de la incubación espermática. Al cabo de los 120 min, se agregó 15 µM de progesterona por otros 15 min. Luego, se evaluó el porcentaje de espermatozoides reaccionados por la tinción HOS-Spermac. Las barras representan la media ± S.E.M. de 5 experimentos. (\*): P< 0.05 (progesterona vs. L-NAME ó NO<sub>2</sub>-arg); control vs. L-NAME ó NO<sub>2</sub>-arg no es significativo.



**Figura III.12: Efecto del L-NAME y de la NO<sub>2</sub>-arginina a distintos tiempos durante la capacitación. Se adicionó L-NAME (0.6 mM) ó NO<sub>2</sub>-arg (0.6 mM) a los 60 ó 90 min de la capacitación. A los 120 min de comenzada la incubación, los espermatozoides se expusieron a 15 µM de progesterona por otros 15 min. Luego, se evaluó el porcentaje de espermatozoides reaccionados por la tinción HOS-Spermac. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos. (\*):  $P < 0.01$  y (\*\*):  $P < 0.001$  (progesterona vs. tratados); no existen diferencias significativas entre el control y los tratados ni entre los grupos tratados.**

de spermine-NONOate fue semejante al observado con 15  $\mu$ M de progesterona (*Figura III.13*).

Para corroborar que el efecto observado con spermine-NONOate era debido al NO, la solución de spermine-NONOate se dejó durante 24 hs a 37 °C bajo atmósfera gaseada, a fin de permitir la liberación del NO (*Zini y col. 1995*). Luego, los espermatozoides se capacitaron y se expusieron durante 15 min a dicha solución. En este caso, no se observó estimulación alguna.



**Figura III.13: Efecto del generador de óxido nítrico, spermine-NONOate sobre la reacción acrosomal en el ratón. Los espermatozoides se capacitaron en MF durante 120 min y luego se expusieron a distintas concentraciones de spermine-NONOate durante otros 15 min. Se midió el porcentaje de espermatozoides reaccionados por la tinción HOS-Spermac. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. de 5 experimentos.**

( $\ast$ ):  $P < 0.05$  (tratados vs. progesterona); los grupos de spermine-NONOate (0.01 mM y 0.6 mM) no difieren significativamente del grupo control.

### 3. EVIDENCIAS INMUNOLOGICAS DE LA PRESENCIA DE LA NO-SINTASA EN EL ESPERMATOZOIDE MURINO

Los estudios farmacológicos presentados hasta aquí sugieren que la NO-sintasa espermática participa en el proceso de fertilización, específicamente sobre la motilidad espermática y la exocitosis acrosomal. Con el fin de precisar la presencia de esta enzima en el espermatozoide, decidimos realizar ensayos inmunológicos. El estudio se llevó a cabo mediante el desarrollo de las siguientes técnicas:

- inmunofluorescencia indirecta.
- western blot.

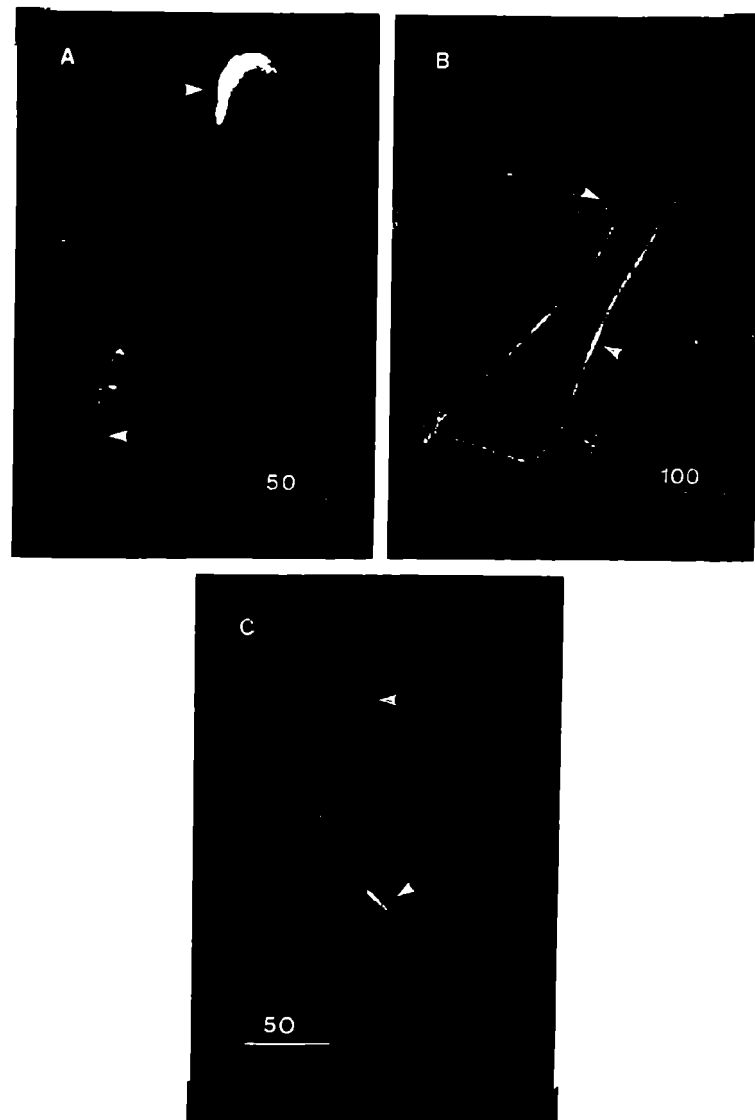
#### 3.1. LOCALIZACION CELULAR DE LA NO-SINTASA ESPERMATICA POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se evidenció la presencia de la enzima NO-sintasa en espermatozoides murinos con un anticuerpo para la NO-sintasa constitutiva (NOS-B).

Los espermatozoides se capacitaron durante 150 min y a distintos tiempos durante la incubación se determinó el porcentaje de células con fluorescencia específica. En cualquiera de los tiempos medidos, el porcentaje de células con marca fue del 88% al 98%. No se detectó fluorescencia específica en los controles negativos.

La fluorescencia específica apareció en la cabeza y en la cola del espermatozoide murino. En la cola, la mayor fluorescencia se observó en la región ubicada por debajo del segmento medio (*Figura III.14.A, B y C*). La localización de la enzima en la región de la cabeza del espermatozoide presentó tres patrones característicos:

- (a) **Patrón I:** una intensa fluorescencia localizada en el acrosoma (capuchón acrosomal y segmento ecuatorial) (*Figura III.14.A*).
- (b) **Patrón II:** no se observó fluorescencia en la cabeza (*Figura III.14.B*).
- (c) **Patrón III:** una tenue fluorescencia localizada sólo en el capuchón acrosomal (*Figura III.14.C*).



**Figura III.14: Localización de la enzima NO-sintasa en espermatozoides de ratón por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. (a) Patrón I: fluorescencia intensa localizada en el acrosoma (capuchón acrosomal y segmento ecuatorial); (b) Patrón II: sin fluorescencia en el acrosoma y (c): Patrón III: tenue fluorescencia en el capuchón acrosomal. Los tres patrones también presentan fluorescencia por debajo del segmento medio del flagelo.**

### 3.1.1. Variación de los patrones de localización de la NO-sintasa en la capacitación *in vitro*

Los tres patrones mencionados anteriormente (I, II y III) coexistieron en todas las muestras examinadas. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con marca en el acrosoma (patrón I) disminuyó con el tiempo de incubación. Espermatozoides epididimarios frescos presentaron un 41.6% del patrón I. Este porcentaje disminuyó a 18.6% luego de 90 min de incubación y prácticamente desapareció (1%) a los 150 min. Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides sin marca en la región acrosomal (patrón II) aumentó durante el transcurso de la incubación. A tiempo 0, sólo el 31.7% de los espermatozoides tenían el patrón II, pero a los 90 y 150 min este porcentaje aumentó a 48.7% y 77.2% respectivamente (*Figura III.15*).

En la *Figura III.15* también se puede observar que existe una relación entre el patrón I y el patrón II. El grado de desaparición de fluorescencia en el acrosoma (patrón I) iguala al grado de aparición de espermatozoides sin fluorescencia en esa región (patrón II). Además, la suma de los porcentajes del patrón I y el II dan porcentajes que oscilan entre el 67.3% al 78.2% para cualquier punto dado.

El porcentaje de espermatozoides que poseen el patrón III (una tenue fluorescencia en el acrosoma) no varió significativamente (de 16.8% a 24.8%) durante el período de incubación *in vitro*.

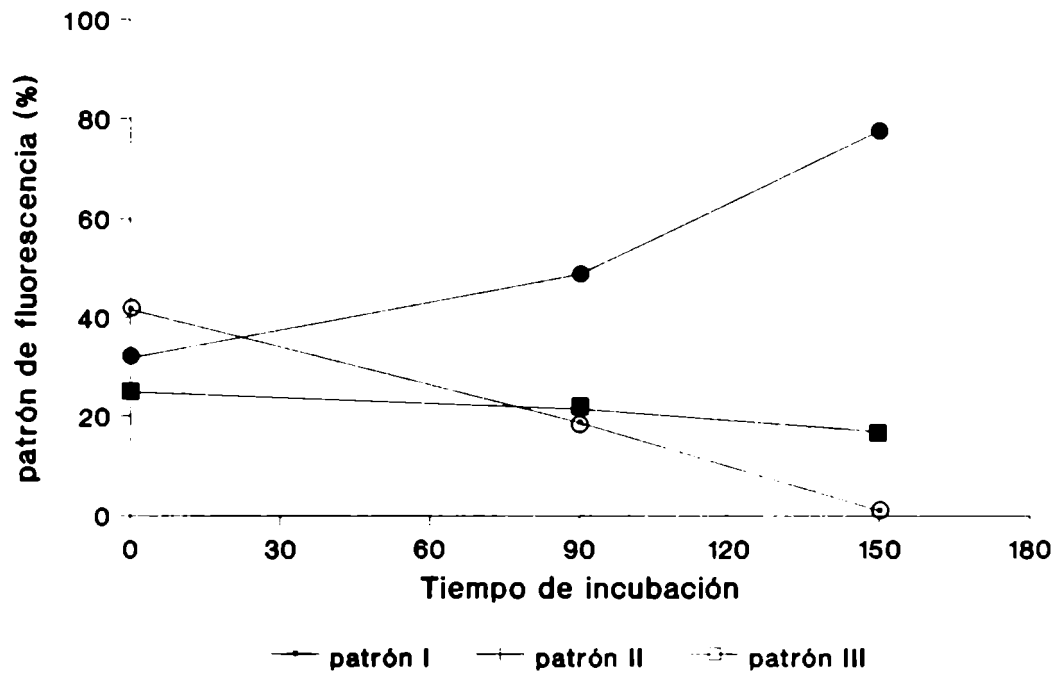
Entonces, estos resultados nos sugieren que durante la capacitación y/o la exocitosis acrosomal, la fluorescencia presente en el acrosoma desaparece mientras que la marca en el flagelo no se pierde.

### 3.2. IDENTIFICACION POR WESTERN BLOT DE LA NO-SINTASA ESPERMATICA

Cuando las proteínas solubilizadas de espermatozoides epididimarios de ratón se incubaron bajo condiciones no reductoras y fueron sometidas a Western Blot, una fracción proteica de 140 kD fue reconocida por los tres anticuerpos anti-NOS (neuronal, endotelial e inducible). Sin embargo, bajo condiciones reductoras, esta banda no pudo ser detectada con ninguno de los tres anticuerpos anti-NOS ensayados (*Figura III.16*).

Paralelamente se sembraron proteínas solubilizadas de corteza cerebral de rata (control positivo), que revelaron una banda principal de 150 kD en presencia del anticuerpo anti NOS-B (neuronal). Como control negativo, las muestras se incubaron en ausencia de los anticuerpos anti-NOS, obteniéndose en todos los casos señal negativa.





**Figura III.15: Variación temporal de los patrones de fluorescencia en el espermatozoide de ratón. Los espermatozoides se capacitaron en MF y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas de la suspensión espermática y se realizó el protocolo de inmunofluorescencia indirecta detallado en la sección II.5 de "Materiales y Métodos". Luego, se determinó el porcentaje de células que presentaron el patrón I (●), el patrón II (■) ó el patrón III (◉).**

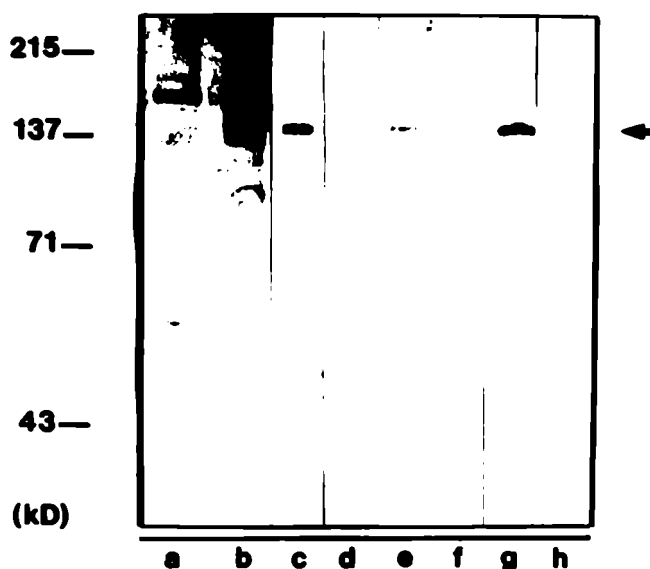


Figura III.16: Reconocimiento de la enzima NO-sintasa espermática mediante el análisis por Western Blot. Extractos crudos de cerebro y cerebelo de rata y proteínas solubilizadas de espermatozoides frescos de ratón fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida (7.5%) en presencia de SDS y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Luego, fueron incubados con anticuerpos anti NO-sintasa (neuronal: NOS-B, endotelial: NOS-E ó inducible: NOS-I) en una dilución 1:2000 y finalmente reveladas por medio de un sistema de detección de alta sensibilidad. Carril a: cerebro de rata, carril b: cerebelo de rata: ambos carriles se revelaron con el anticuerpo NOS-B y se utilizaron como controles positivos. Las proteínas solubilizadas de espermatozoides se revelaron con NOS-B (carriles c-d), con NOS-E (carriles e-f) ó con NOS-I (carriles g-h). Los carriles a-b-d-f-h se trataron bajo condiciones reductoras (BME) mientras que los carriles c-e-g se trataron bajo condiciones no reductoras. La NO-sintasa presente en homogenatos de cerebro y cerebelo de rata exhibieron una movilidad similar con un peso molecular de 150 kD. Las bandas de proteínas marcadas con una flecha representan la NO-sintasa de espermatozoides murinos (140 kD) revelada con los tres anticuerpos. Los resultados son representativos de 4 blots.

#### 4. EVIDENCIAS BIOQUIMICAS DE LA PRESENCIA DE LA NO-SINTASA EN EL ESPERMATOZOIDE MURINO

Hasta el momento, todos los experimentos realizados evidencian la presencia de la NO-sintasa en el espermatozoide y su participación en el proceso de fertilización *in vitro*. Los siguientes ensayos tienen por objeto detectar la formación de NO a partir de L-arginina como sustrato y poder así corroborar la capacidad de la gameta masculina para sintetizar NO.

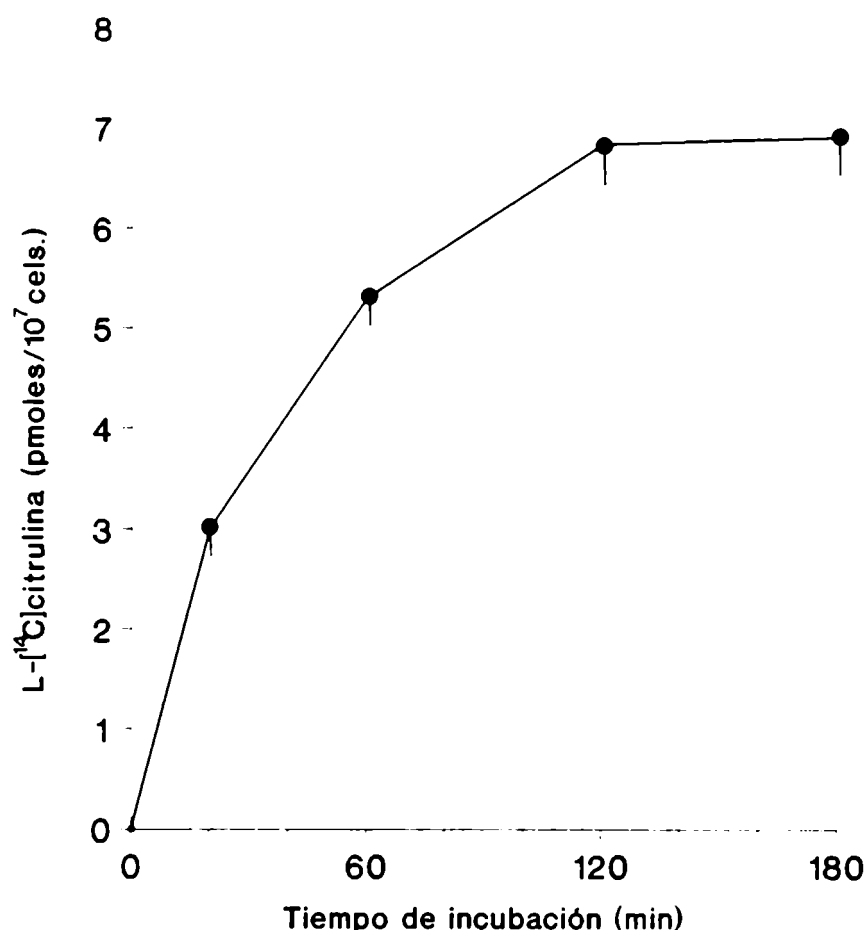
##### 4.1. CONVERSION DE L-[<sup>14</sup>C]ARGININA A L-[<sup>14</sup>C]CITRULINA Y PRODUCCION DE OXIDO NITRICO POR ESPERMATOZOIDES MURINOS

Primeramente, realizamos ensayos cinéticos para detectar la formación de L-[<sup>14</sup>C]citrulina. Los espermatozoides se capacitaron durante 180 min, se adicionó L-[<sup>14</sup>C]arginina al comienzo de la incubación y a distintos tiempos se determinó la formación de L-[<sup>14</sup>C]citrulina.

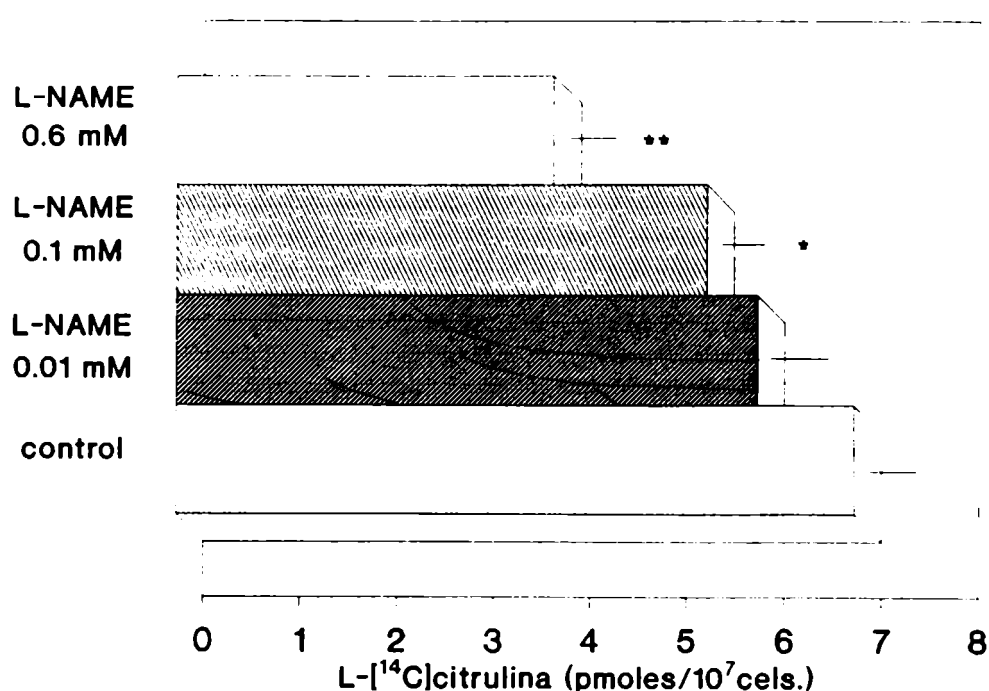
La *Figura III.17* muestra un aumento gradual en la síntesis de NO durante el período de capacitación, alcanzando un plateau a los 120-180 min. Los espermatozoides capacitados ( $10^7$  células) producen  $7.0 \pm 2.1$  picomoles de L-[<sup>14</sup>C]citrulina en presencia de  $5.0 \mu\text{M}$  de L-[<sup>14</sup>C]arginina.

La producción de L-[<sup>14</sup>C]citrulina en estas células fue específicamente inhibida en presencia de  $0.6 \text{ mM}$  de L-NAME (44% de inhibición) y de  $0.1 \text{ mM}$  de L-NAME (22% de inhibición), pero no hubo inhibición con  $0.01 \text{ mM}$  de L-NAME (*Figura III.18*). Esta inhibición específica confirma que bajo nuestras condiciones experimentales, la conversión de L-arginina a L-citrulina se debe específicamente a la actividad de la NO-sintasa. Sin embargo, como el L-NAME puede inhibir tanto la NO-sintasa constitutiva como la inducible, utilizamos un inhibidor específico para la isoforma inducible (aminoguanidina: AG). En esos experimentos, no observamos inhibición (control:  $7.0 \pm 2.1$  vs. AG:  $6.32 \pm 1.4$ ), corroborando nuevamente la presencia de la isoforma constitutiva en el espermatozoide murino.

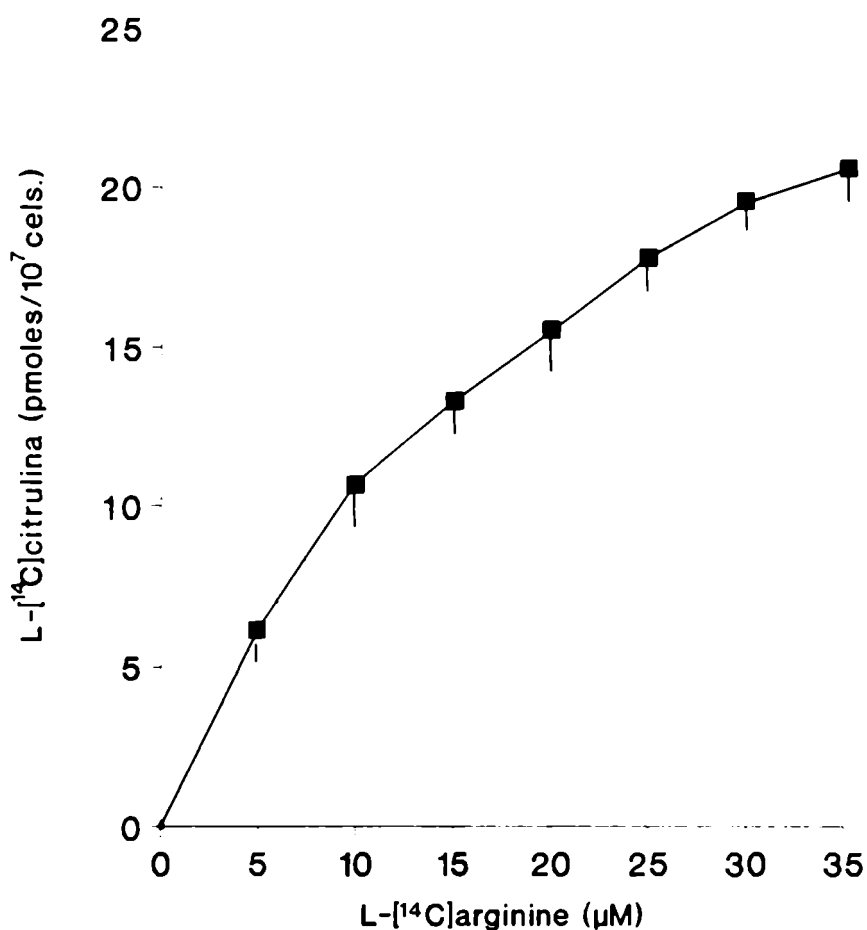
Cuando los espermatozoides fueron incubados durante 120 min en presencia de distintas concentraciones de L-arginina se produjo un aumento concentración-dependiente del producto L-citrulina y por lo tanto de NO (*Figura III.19*).



**Figura III.17: Formación de óxido nítrico (NO) en espermatozoides murinos durante el período de capacitación *in vitro*.** Los espermatozoides ( $1.5-2.5 \times 10^7$ ) se incubaron en 500  $\mu$ l de MF adicionado con 5.0  $\mu$ M de L-[<sup>14</sup>C]arginina. A tiempo 0, 60, 120 y 180 min de incubación se determinó la formación de NO mediante la conversión estequiométrica de L-[<sup>14</sup>C]arginina a L-[<sup>14</sup>C]citrulina y NO (Bredt y Snyder, 1989). Los valores son expresados como picomoles de L-[<sup>14</sup>C]citrulina/10<sup>7</sup> células. Los puntos graficados representan la media de tres ensayos  $\pm$  S.E.M.. En cada ensayo los distintos grupos se realizaron por triplicado.



**Figura IIL18: Efecto del L-NAME sobre la formación de óxido nítrico.** La producción de NO fue medida por la técnica descrita por Bredt y Snyder (1989). Los espermatozoides ( $1.5-2.5 \times 10^7$ ) se incubaron en 500  $\mu$ l de MF en presencia ó ausencia de distintas concentraciones de L-NAME. Luego de 30 min de incubación, se adicionó 5.0  $\mu$ M de L-[<sup>14</sup>C]arginina y la incubación continuó durante otros 120 min. Los valores son expresados como picomoles de L-[<sup>14</sup>C]citrulina /10<sup>7</sup> células producidos en 120 min. Las barras representan la media de tres ensayos  $\pm$  S.E.M.. En cada ensayo los distintos grupos se realizaron por triplicado. (\*):  $P < 0.05$  y (\*\*):  $P < 0.01$  (tratados vs. control).



**Figura III.19: Formación de óxido nítrico dependiente de la concentración de L-arginina en espermatozoides capacitados de ratón. Los espermatozoides ( $1.5-2.5 \times 10^7$ ) se incubaron durante 120 min en 500  $\mu$ l de MF adicionado con L-[<sup>14</sup>C]arginina (5.0  $\mu$ M-35.0  $\mu$ M) y la formación de NO se determinó mediante la técnica descrita por Bredt y Snyder (1989). Los valores son expresados como picomoles de L-[<sup>14</sup>C]citrulina/10<sup>7</sup> células producidos en 120 min. Los puntos graficados representan la media de tres ensayos  $\pm$  S.E.M.. En cada ensayo los distintos grupos se realizaron por triplicado.**

#### 4.2. LA PROGESTERONA ESTIMULA LA FORMACION DE OXIDO NITRICO EN ESPERMATOZOIDES CAPACITADOS

Dado que en los experimentos farmacológicos evidenciamos la participación de la NO-sintasa espermática en la exocitosis inducida por progesterona (sección III.2.4.), decidimos corroborar el efecto de 15  $\mu$ M de progesterona (P) sobre la formación de NO.

El agregado de progesterona (15  $\mu$ M) a espermatozoides capacitados (90 min) estimuló la producción de L-[ $^{14}$ C]citulina en un 42.5% (control:  $9.02 \pm 0.22$  vs. (P):  $12.85 \pm 0.99$ )  $P=0.0089$ .

Por lo tanto, podemos sugerir que el NO sintetizado por la NO-sintasa espermática, media los efectos de la progesterona en la exocitosis acrosomal *in vitro*.

## 5. EFECTO DEL OXIDO NITRICO EN LA SINTESIS DE EICOSANOIDES ESPERMATICOS

Hasta el momento, hemos evidenciado que el NO, sintetizado por el espermatozoide interviene en la función espermática, específicamente sobre la motilidad y la reacción acrosomal.

Trabajos recientes demostraron que el NO actúa modulando enzimas que poseen un grupo hemo y las enzimas responsables de la síntesis de PGs e hidroxiácidos pertenecen a este grupo (Rettori *y col.* 1993; Salvemini *y col.* 1993).

Por lo tanto para concluir este trabajo de tesis, nos pareció interesante poder relacionar en nuestro sistema a las PGs e hidroxiácidos con el NO, dado que en trabajos anteriores habíamos demostrado la participación de las prostaglandinas ovocitarias en el proceso de fertilización, las cuales intervenían específicamente en la reacción acrosomal (Viggiano *y col.* 1995; Herrero *y col.* 1995).

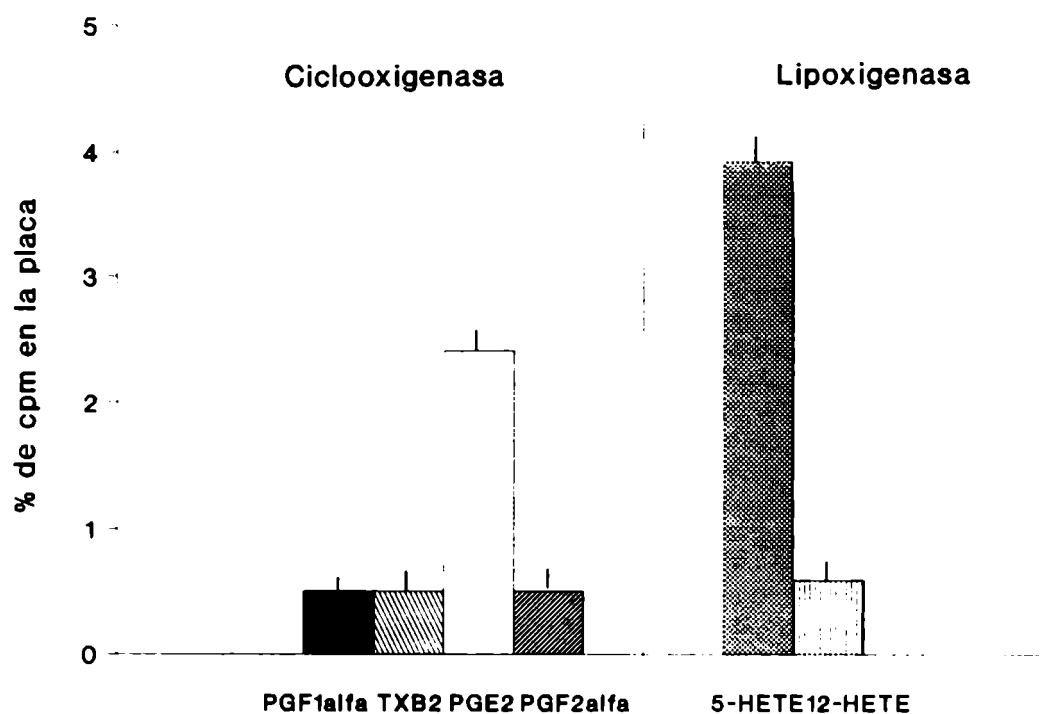
### 5.1. SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS E HIDROXIACIDOS ESPERMATICOS

Primeramente determinamos si los espermatozoides de ratón eran capaces de sintetizar PGs e hidroxiácidos, ya que hasta el momento sólo se había descrito en espermatozoides humanos y bovinos (Roy y Ratnam, 1992; Shalev *y col.* 1994). Así, los espermatozoides incubados durante 120 min fueron capaces de convertir  $2.4 \pm 0.3$  % de [ $^{14}\text{C}$ ] ácido araquidónico a  $\text{PGE}_2$  y  $3.9 \pm 1.1$  % a 5-HETE (*Figura III.20*). También se midieron los otros productos derivados de la ciclooxigenasa como la 6-cetoPGF $_{1\alpha}$ , la PGF $_{2\alpha}$  y el TXB $_2$  y los derivados de la lipoxigenasa (12-HETE) pero no se observó una síntesis significativa de estos metabolitos. Se consideró como síntesis significativa a valores superiores al 1% de cpm en la placa.

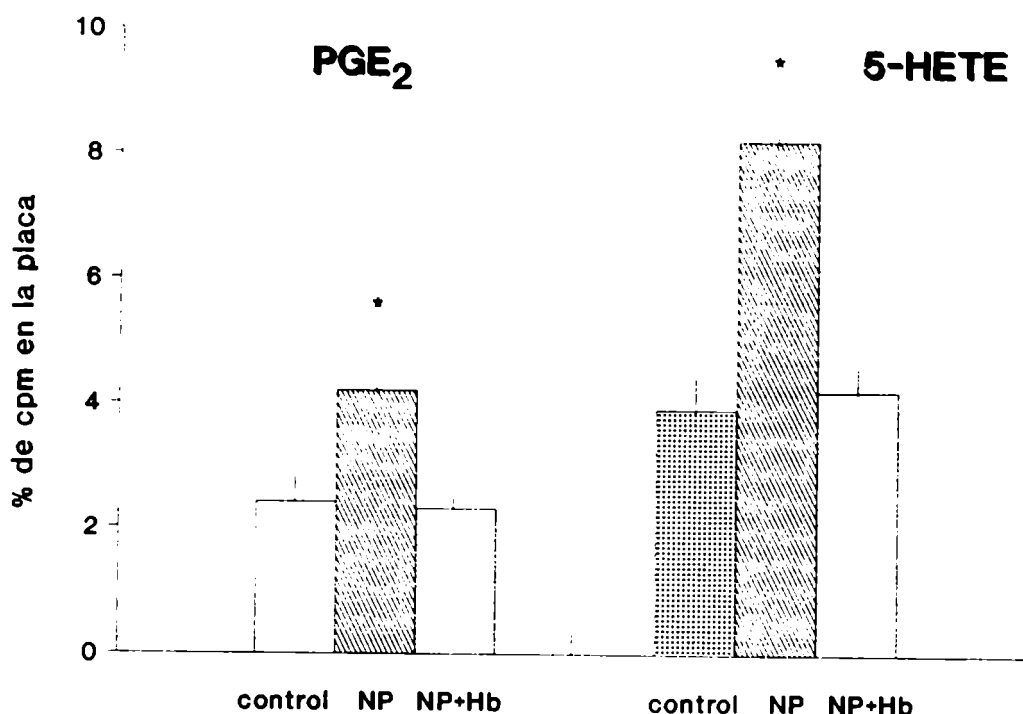
### 5.2. ESTIMULACION DEL OXIDO NITRICO EN LA SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS E HIDROXIACIDOS

Con el propósito de estudiar el efecto del NO en la síntesis de metabolitos derivados del ácido araquidónico, los espermatozoides se incubaron en presencia de 150  $\mu\text{M}$  de NP y al cabo de 60 min se adicionó [ $^{14}\text{C}$ ]AA. A los 120 min de comenzada la incubación, la síntesis de  $\text{PGE}_2$  aumentó dos veces comparada con el control mientras que el metabolito 5-HETE se incrementó cuatro veces en relación al control (*Figura III.21*). Los otros metabolitos de la vía de la





**Figura III.20:** Biosíntesis de prostanoïdes e hidroxiácidos por espermatozoides de ratón a partir de [ $^{14}$ C]ácido araquidónico (AA) *in vitro*. Espermatozoides provenientes del epidídimo caudal de ratón ( $6-9 \times 10^7/\text{ml}$ ) se incubaron durante 60 min en MF. Luego, el metabolismo del AA exógeno se determinó incubando las células por otros 60 min en MF adicionado con  $0.25 \mu\text{Ci}$  de [ $^{14}$ C]AA en un volumen total de 1 ml. La síntesis de prostaglandinas (PGs) y de hidroxiácidos se consideró significativa cuando el porcentaje de cpm en la placa fue superior al 1%.



**Figura III.21:** Efecto del nitroprusiato de sodio (NP) sobre el metabolismo basal de los productos de la lipoxigenasa y de la ciclooxygenasa. Los espermatozoides ( $6-9 \times 10^7$  células/ml) se incubaron en MF adicionado con NP (150  $\mu$ M) ó NP (150  $\mu$ M)+Hb (20  $\mu$ g/ml) durante 60 min. Luego, el metabolismo del AA exógeno se determinó incubando los espermatozoides por otros 60 min en MF adicionado con 0.25  $\mu$ Ci de [ $^{14}$ C]AA en un volumen total de 1 ml. Sólo se detectó síntesis y liberación de PGE<sub>2</sub> y de 5-HETE. (\*):  $P < 0.05$ : NP vs control. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos.

ciclooxigenasa y de la vía de la lipoxigenasa también se midieron, pero no se detectó síntesis de los mismos en presencia de NP.

Para corroborar que la estimulación se debía al efecto del NO sobre estas enzimas, los espermatozoides se incubaron en presencia de NP (150  $\mu$ M) y hemoglobina (20  $\mu$ g/ml). El porcentaje de cpm en la placa para PGE<sub>2</sub> y 5-HETE fue semejante al obtenido en el control (*Figuras III.21*).

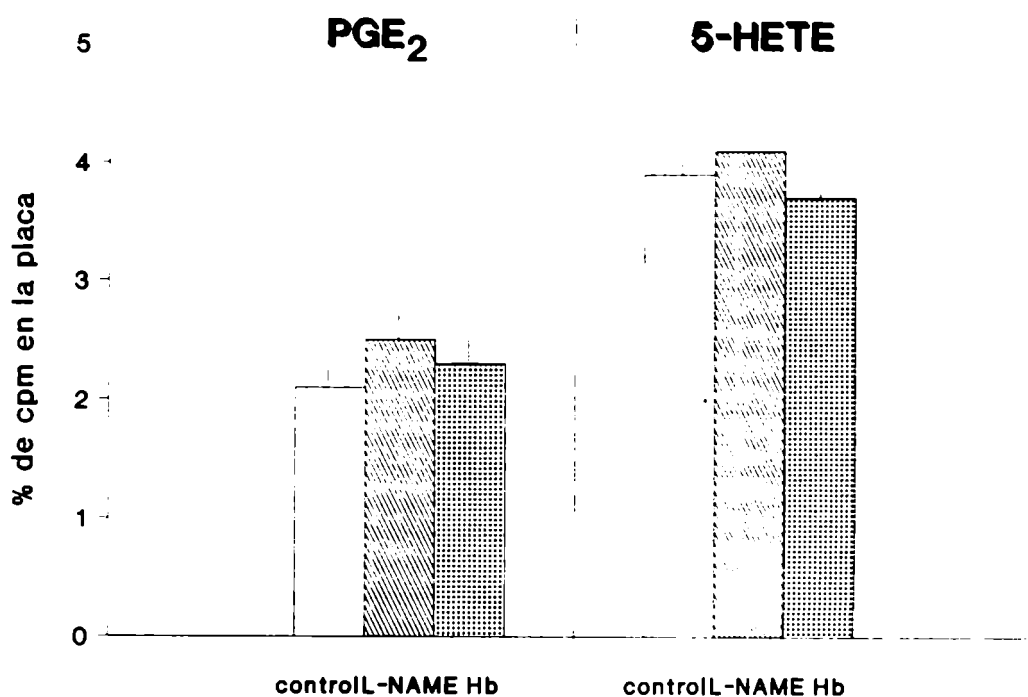
Estos resultados demuestran que los espermatozoides murinos sintetizan PGs e hidroxiácidos y esta síntesis es estimulada por el agregado de NO exógeno.

### **5.3. EFECTO DEL L-NAME EN LA SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS E HIDROXIACIDOS ESPERMATICOS**

Para finalizar y dado que el NO exógeno es capaz de estimular la síntesis de PGs e hidroxiácidos espermáticos, nos cuestionamos si un inhibidor de la síntesis de NO (L-NAME) podía modificar el patrón de síntesis de estos metabolitos.

Sin embargo, cuando los espermatozoides fueron incubados en presencia de 1 mM de L-NAME, la síntesis basal de PGs e hidroxiácidos no fue afectada. De manera semejante, la presencia de hemoglobina (atrapador de NO) no modificó la síntesis basal de estos metabolitos (*Figura III.22*).

Estos resultados sugieren que la síntesis basal de NO presente en el espermatozoide no modifica la liberación y síntesis de los productos derivados de la ciclo y de la lipoxigenasa por lo menos durante el tiempo de incubación estudiado (120 min).



**Figura III.22:** Efecto del L-NAME y de la Hb sobre el metabolismo basal de los productos de la lipoxigenasa y de la ciclooxygenasa. Los espermatozoides ( $6-9 \times 10^7$  células/ml) se incubaron en MF adicionado con L-NAME (1.0 mM) ó Hb (20  $\mu$ g/ml) durante 60 min. Luego, el metabolismo del AA exógeno se determinó incubando las células por otros 60 min en MF adicionado con 0.25  $\mu$ Ci de [ $^{14}$ C]AA en un volumen total de 1 ml. Sólo se detectó síntesis y liberación de PGE<sub>2</sub> y de 5-HETE. . Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos.

## **CAPITULO IV**

### **Discusión**

La fertilización es un proceso que requiere de una delicada regulación y selección de las gametas. Existen mecanismos que operan a múltiples niveles (e.g. comportamiento, ciclos hormonales, fisiología e interacción del ovocito y del espermatozoide) para asegurar la continuidad de las distintas especies. La fina interacción entre gametas es una de las etapas más ordenadas y reguladas de todo el ciclo reproductivo. A medida que el espermatozoide avanza por el tracto genital de la hembra, existe una serie de procesos selectivos, con variantes según la especie, que limitan la llegada del espermatozoide al sitio de fertilización. Estos procesos selectivos son tanto anatómicos como ambientales. Entre ellos se pueden incluir: la interacción entre el espermatozoide y el moco cervical, la presencia de células del sistema inmunológico y el entorno iónico, incluyendo variaciones en el pH y las secreciones del tracto reproductivo femenino (Yanagimachi, 1994). Además, el espermatozoide que llega a la zona de la ampolla en el oviducto encuentra nuevas barreras selectivas asociadas al ovocito ovulado: el cúmulus y la zona pelúcida.

Muchos son los factores y moléculas de naturaleza diversa (lipídicos, esteroideos y peptídicos) descritos en la interacción ovocito-espermatozoide. A fin de la década del '80 se descubre la existencia del gas óxido nítrico, el cual es considerado como mensajero intra e intercelular y actualmente el NO se ha descrito en diferentes sistemas fisiológicos (Nathan, 1992).

En *reproducción*, se vió que el NO actúa a varios niveles; entre ellos se pueden citar la estimulación del factor liberador de la hormona luteinizante (LH-RH), la cual induce el comportamiento de apareo (Rettori y col. 1993), la inducción de la erección peniana (Lugg y col. 1995) y la modulación de la síntesis de prostaglandinas uterinas y ováricas durante la luteólisis en la rata (Motta y col. 1995). En 1995, Burnett y col. (1995) localizaron la enzima NO-sintasa en diferentes órganos del tracto genital masculino de rata mientras que Chamness y col. (1995) describen el efecto de los andrógenos sobre esta enzima. Hasta el momento, se han realizado pocos experimentos destinados a conocer el papel del NO en la fisiología del espermatozoide.

Los resultados presentados en esta tesis constituyen las primeras evidencias de la presencia de la NO-sintasa en la gameta masculina y de su relación con la fisiología del espermatozoide..

Cuando se comenzaron a describir las distintas isoformas de la NO-sintasa, la enzima se

nombraba según el tejido donde se hallaba (e.g. *b*NO-sintasa se descubrió primero en cerebro -"brain"- de rata). Luego, se demostró que la NO-sintasa neuronal estaba ampliamente distribuida en tejidos no neuronales y presentaba variaciones en el peso molecular, sugiriendo cierto grado de especificidad enzimática. Algunos ejemplos son la NO-sintasa de placenta (125 kD), de hígado (100 kD) y de pulmón (140 kD) (Springall *y col.* 1992).

Nuestros resultados con la técnica de "immunoblotting" indican que anticuerpos específicos dirigidos contra la NO-sintasa tanto de carácter constitutivo (NOS-B y NOS-E) como inducible (NOS-I) son capaces de reconocer en el espermatozoide una única fracción proteica de 140 kD bajo condiciones desnaturalizantes y no reductoras. El hecho que los tres anticuerpos reconozcan una banda de igual peso molecular sugiere que se trata de una sola isoforma, cuya estructura posee cierto grado de homología con las NO-sintasas neuronal, endotelial e inducible.

Otros trabajos demuestran que anticuerpos policlonales dirigidos contra la NO-sintasa neuronal pueden reconocer a la isoforma endotelial (Springall *y col.* 1992) y a una proteína similar en el útero de rata (Suburo *y col.* 1995) y órganos sexuales masculinos (Chamness *y col.* 1995). Además, está documentado que existe un 50% de homología entre las tres isoformas, permitiendo la reactividad cruzada entre los tres anticuerpos (Nathan, 1992).

Si aceptamos que el espermatozoide no es capaz de sintetizar proteínas *de novo*, la señal positiva revelada con el anticuerpo NOS-I se puede atribuir a la reactividad cruzada entre la NO-sintasa espermática y la isoforma inducible.

Cuando los espermatozoides son tratados con un agente reductor (2-mercaptoetanol), no se detecta la banda de 140 kD y ninguna otra banda puede ser visualizada. Este resultado sugiere que la capacidad de unión que posee la NO-sintasa al anticuerpo se pierde en presencia de 2-mercaptoetanol. Por lo tanto, los puentes disulfuro de la NO-sintasa del espermatozoide son necesarios para mantener la estructura apropiada de los epitopes, los cuales son reconocidos por los diferentes antisueros.

Podemos decir entonces, que los resultados obtenidos por Western Blot demuestran la existencia de una isoforma de la NO-sintasa, probablemente característica del espermatozoide murino. De todos modos, para poder corroborar estos resultados, creemos que es necesario trabajar con la NO-sintasa espermática purificada, en lugar de extractos de proteínas solubilizadas de espermatozoides.

La NO-sintasa es localizada por inmunofluorescencia en el acrosoma y en la parte media del flagelo. Esta localización de la NO-sintasa en el espermatozoide (cabeza y flagelo) puede ser indicativa de su función en esta célula. Además, la población de espermatozoides epididimarios no es homogénea con respecto a la distribución de la enzima. Una fracción de la población de espermatozoides presenta una fuerte fluorescencia en el acrosoma y en la cola, mientras que otra presenta fluorescencia sólo en la cola y también existe una tercera fracción que presenta una tenue fluorescencia en la cabeza y en la cola. Más aún, existen variaciones temporales relacionadas con la desaparición de la fluorescencia en la región acrosomal del espermatozoide, que se corresponden con el lapso previsto para que ocurra la capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide murino. La desaparición de la marca de la NO-sintasa a los 150 min podría ser atribuida a un cambio de localización durante la capacitación ó a la pérdida de la enzima durante el proceso exocitótico. Nuestros experimentos no nos permiten establecer esta diferencia y por lo tanto no podemos asignar todavía un significado fisiológico preciso a dichos cambios.

Lo que sí podemos afirmar es que la función plena de la NO-sintasa está directamente relacionada con la plena expresión de la capacidad fertilizante del espermatozoide. La presencia de diferentes inhibidores de la NO-sintasa como el L-NAME ó la  $\text{NO}_2$ -arg durante la capacitación espermática produce una disminución significativa en el número de ovocitos fertilizados. El L-NAME y la  $\text{NO}_2$ -arg inhiben mayormente a las NO-sintasas de caracter constitutivo y en menor medida a la NO-sintasa inducible. Corbett *y col.* (1992) describen una inhibición selectiva de la isoforma inducible por la aminoguanidina. El efecto dispar obtenido entre L-NAME y  $\text{NO}_2$ -arg comparado con la aminoguanidina sugiere, una vez más, que la NO-sintasa del espermatozoide es de caracter constitutivo.

En el proceso de fertilización, la inhibición observada con L-NAME depende de la concentración. Las concentraciones de L-NAME utilizadas para observar un efecto significativo están en el orden de las que se utilizan en otros tejidos. La especificidad del efecto inhibitorio del L-NAME queda demostrada por la reversión de su efecto con L-arginina (en altas concentraciones) pero no con D-arginina, dado que la síntesis de NO vía NO-sintasa es específica para el enantiómero L-arginina. Además, determinamos que el D-NAME, enantiómero inactivo del L-NAME, no ejerce efecto inhibitorio en la fertilización. Estos datos confirman entonces, el efecto específico del L-NAME en la fertilización *in vitro*.



Es importante destacar que el efecto inhibitorio del L-NAME se ejerce únicamente sobre la gameta masculina porque no se observa inhibición cuando los ovocitos son tratados con L-NAME. Sin embargo, estos experimentos no descartan la posibilidad que el ovocito posea la enzima NO-sintasa, la cual en caso de participar en el proceso de fertilización, se encontraría afectada a concentraciones y/o tiempos diferentes de los ensayados. De hecho, un trabajo de Van Voorhis *y col.* (1994) establece que las células de la granulosa de rata poseen la NO-sintasa y sintetizan NO, el cual interviene inhibiendo la esteroidogénesis.

Si la NO-sintasa participa en el proceso de fertilización debe hacerlo necesariamente a través de su intervención en algunos de los procesos claves de los cuales depende la capacidad fertilizante del espermatozoide. La capacitación como la hiperactivación y la reacción acrosomal ocurren en el tracto genital femenino. Como consecuencia de la capacitación, el espermatozoide se hiperactiva y es susceptible de responder a estímulos que desencadenan la reacción acrosomal. Así, el espermatozoide adquiere la capacidad para penetrar la zona pelúcida y luego fusionarse con el ovocito.

Dado que inhibidores de la NO-sintasa afectan al proceso de fertilización, nos preguntamos si la NO-sintasa del espermatozoide intervenía también en los patrones de motilidad y de hiperactivación espermática. Cuando tratamos a los espermatozoides con L-NAME en un medio capacitante, la motilidad general y el patrón de hiperactivación disminuyen significativamente respecto al control.

Además, la motilidad espermática es afectada en forma concentración-dependiente por un generador de NO (NP). También observamos que altas concentraciones de NP (300  $\mu$ M) disminuyen significativamente la motilidad espermática y comprobamos que esta disminución se debe a la pérdida de viabilidad de los espermatozoides.

Nuestros resultados no explican la causa del efecto tóxico del NO a altas concentraciones, sin embargo, se lo podría relacionar con el proceso de respiración mitocondrial (Comporti, 1989) y el de lipoperoxidación (Griveau *y col.* 1995). Los espermatozoides requieren gran cantidad de ATP como fuente de energía para mantener la motilidad. Posiblemente, el NO inhiba enzimas tales como la aconitasa, la gliceraldeído fosfato deshidrogenasa o proteínas mitocondriales, provocando una depleción de ATP, que se verá reflejada en una pérdida de la motilidad (Weinberg *y col.* 1995).

A diferencia de otras células, el espermatozoide utiliza todo el ATP para moverse y no

para la biosíntesis de membranas; por lo tanto pierde la capacidad de realizar auto-reparaciones. El espermatozoide posee todas las enzimas defensivas antioxidantes: catalasa (Jeulin *y col.* 1989), glutatión peroxidasa (Alvarez y Storey, 1989) y superóxido dismutasa (SOD) (Mennella y Jones, 1980). Sin embargo, la efectividad de estas enzimas está limitada por su concentración y distribución. Todas estas enzimas protectoras están localizadas en el citoplasma, el cual ocupa un lugar muy pequeño en el espermatozoide. Por lo tanto, la gameta masculina es susceptible al stress oxidativo, condición asociada al aumento de daño celular inducido por las especies reactivas del oxígeno (ROS).

Dado que en los experimentos realizados con NP el efecto del NO está íntimamente relacionado con la concentración de NP utilizada, se puede pensar que 300  $\mu$ M de NP produce una cantidad de NO tal que supera la acción de las enzimas protectoras como la SOD, favoreciendo el proceso de lipoperoxidación e inhibiendo la respiración celular. Sin embargo, estas ideas entran meramente en el campo especulativo y sería muy interesante poder comprobarlas.

Es de notar que experimentos realizados por Hellström *y col.* (1994) señalan que bajas concentraciones de NP (50 y 100 nM) favorecen la motilidad y la viabilidad de espermatozoides humanos sometidos a congelamiento y descongelamiento; así como también reducen el daño lipoperoxidativo de las membranas espermáticas. Trabajos recientes sugieren que el espermatozoide y el ovocito poseen la capacidad inherente pero limitada de generar ROS, las cuales favorecen el proceso de fertilización (Sikka *y col.* 1995).

A la luz de estos resultados, en donde bajas concentraciones de NO favorecen la función espermática mientras que altas concentraciones causan daños irreparables en el espermatozoide, se podría pensar como posible hipótesis que en *condiciones fisiológicas*, el NO liberado por el tracto genital femenino intervendría como factor de selección en el proceso de fertilización. Sería muy interesante investigar cuales son las concentraciones de NO en el útero y en el oviducto de hembras en proestro y estro, de manera de poder saber si el NO en estos tejidos se modifica en relación al paso de los espermatozoides por el tracto genital femenino. Así, el NO exógeno actuaría como factor de selección favoreciendo la motilidad espermática o disminuyendo la viabilidad de aquellos espermatozoides que de alguna manera son más susceptibles al stress oxidativo.

En los ensayos realizados con NP también medimos el porcentaje de células

hiperactivadas. Se observó que en presencia de 300  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  de NP, el patrón de hiperactivación aparece antes en el tiempo comparado con el control. Sin embargo, con 300  $\mu\text{M}$  de NP el patrón de hiperactivación comienza a decrecer a los 120 min de comenzada la capacitación. Estos resultados sugieren por un lado, que el NO puede estimular la hiperactivación espermática en concentraciones no tóxicas, y por otro lado es razonable pensar que el adelanto en el tiempo del patrón de hiperactivación produce un gran gasto de energía, el cual conduce a una muerte celular temprana.

Estos datos encuadran dentro de la hipótesis de selección, donde el NO sería un regulador fisiológico de la motilidad espermática, favoreciendo el encuentro con el ovocito sólo a una fracción de la población de espermatozoides.

Sin embargo, también es importante poder interpretar los resultados bajo condiciones patológicas. Trabajos recientes establecen que la gran producción de NO liberado por células del sistema inmune en el tracto genital femenino como el exceso de ROS en el semen estarían asociados con la pérdida de motilidad espermática y con la infertilidad (Aitken *y col.* 1989; Tomlinson *y col.* 1992; De Lamirande y Gagnon, 1992).

Hasta el momento, los resultados obtenidos con NP y L-NAME demuestran que el NO (de origen endógeno y/o exógeno) interviene en el proceso de fertilización, modulando al menos la motilidad espermática.

Otro parámetro importante de evaluar en el proceso de fertilización es el de reacción acrosomal, proceso indispensable para que un ovocito sea fertilizado. Durante el proceso de fertilización pudimos observar que los espermatozoides tratados con L-NAME son capaces de unirse a la zona pelúcida pero no pueden atravesarla. Recordamos aquí los resultados de Mollova *y col.* (1992), quienes demuestran que la penetración pero no la unión a zona se encuentra inhibida cuando espermatozoides de camero son incubados en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-dihidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-diaphorasa. Decimos entonces que nuestros resultados convalidan los de Mollova *y col.* ya que recientemente se ha establecido que la distribución de la NO-sintasa corresponde con la de la enzima NADPH-diaphorasa (Dawson *y col.* 1991). Como el NO puede ser considerado como una señal intracelular, nos cuestionamos si en el espermatozoide la NO-sintasa interviene en este proceso.

En el ratón, el estudio de la reacción acrosomal siempre fue dificultoso debido a que el capuchón acrosomal es pequeño y difícil de detectar con el microscopio óptico. En los experimentos realizados medimos la reacción acrosomal murina con un método nuevo desarrollado por nosotros, que combina la coloración Spermac (Oettlè, 1986) con el test hiposmótico (Jeyendran *y col.* 1984) y que llamamos HOS-Spermac. Este método tiene ventajas bien definidas sobre los métodos utilizados tradicionalmente. Es más simple, rápido y de resultados más consistentes que la coloración triple. Aunque no tiene los refinamientos del CTC en cuanto a variedad de patrones, permite manejar un gran número de muestras en poco tiempo y además las muestras pueden guardarse y no necesitan ser evaluadas en el día.

Utilizando HOS-Spermac, determinamos primeramente el perfil temporal de la reacción acrosomal espontánea e inducida por progesterona en nuestro sistema para luego poder observar el efecto de los inhibidores sobre este proceso. En un medio capacitante y en ausencia de inductores fisiológicos los espermatozoides reaccionan a los 180 y 240 min de incubación. Sin embargo, espermatozoides capacitados (120 min) y luego incubados con 15  $\mu$ M de progesterona pierden el capuchón acrosomal rápidamente (15 min).

Con respecto a la reacción acrosomal espontánea, el L-NAME adicionado al comienzo de la incubación produce una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides reaccionados a partir de los 180 min. Al igual que en el proceso de fertilización, este efecto se expresa en forma concentración-dependiente y es estereoespecífico. Sin embargo, en la exocitosis espontánea, el L-NAME no inhibe a todas las concentraciones ensayadas como ocurre en la fertilización, sino que sólo inhibe con las concentraciones más altas (0.6 mM y 1 mM de L-NAME). Esto podría explicarse dado que en el proceso de fertilización existen otros eventos posteriores a la reacción acrosomal (e.g. fusión o reacción cortical), que eventualmente podrían ser inhibidos por el L-NAME a concentraciones menores (0.1 mM y 0.3 mM).

Dado que el inhibidor se encuentra presente durante el transcurso de la capacitación, nuestros resultados sólo nos permiten concluir que el L-NAME inhibe el porcentaje de células reaccionadas espontáneamente, sin poder diferenciar el proceso (capacitación y/o exocitosis acrosomal) sobre el cual actúa.

En relación a la progesterona, nosotros confirmamos que este esteroide es capaz de inducir exocitosis en espermatozoides capacitados de ratón a valores semejantes a los obtenidos por otros autores (Roldán *y col.* 1994); sin embargo resulta interesante observar que la presencia

de inhibidores específicos de la NO-sintasa adicionados al comienzo de la capacitación bloquean el efecto inductor de la progesterona. Para poder determinar qué paso de la fertilización (capacitación-reacción acrosomal) se encuentra afectado, ensayamos la adición de los inhibidores a espermatozoides capacitados ó no capacitados. L-NAME y  $\text{NO}_2\text{-arg}$  inhiben completamente la exocitosis inducida por progesterona independientemente del momento (60 ó 90 min) en que el inhibidor es agregado. Estos resultados sugieren que la NO-sintasa del espermatozoide estaría involucrada directamente en el mecanismo de reacción acrosomal inducida por progesterona.

La idea que la NO-sintasa espermática posee una función en la reacción acrosomal es corroborada con el hecho que un generador de NO como spermine-NONOate estimula directamente la exocitosis con 0.1 mM y 0.3 mM. Es interesante observar que la concentración de 0.1 mM de spermine-NONOate produce el mismo porcentaje (45.3%) de espermatozoides reaccionados que 15  $\mu\text{M}$  de progesterona. El hecho que 0.6 mM de spermine-NONOate inhiba la exocitosis puede relacionarse con lo observado por otros autores (Rengasamy y Johns, 1994; Canteros *y col.* 1995), quienes establecen que altas concentraciones de NP (0.6mM-1.2 mM) inhiben la actividad de la NO-sintasa.

Se puede postular que la NO-sintasa actúa en una etapa posterior a la unión de la progesterona a su receptor, localizado en la membrana plasmática del espermatozoide. Como el receptor de progesterona está acoplado a canales de  $\text{Ca}^{++}$ , es posible que la NO-sintasa (probablemente de caracter constitutivo) se active cuando aumenta el  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, vía entrada de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, al igual que ocurre en otros tejidos.

Aunque nuestros resultados demuestran una participación directa de la NO-sintasa en la reacción acrosomal inducida por progesterona, un trabajo reciente de Zini *y col.* (1995) en espermatozoides humanos establece que el agregado de un generador de NO promueve la capacitación *in vitro*. Sugiere que el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es necesario para la acción del NO y que junto al anión superóxido intervienen en la capacitación, la cual es considerada como parte de un proceso oxidativo. Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad que la NO-sintasa del espermatozoide también intervenga en el proceso de capacitación.

En este trabajo no sólo demostramos la presencia y la localización de la NO-sintasa en el espermatozoide y su participación en procesos claves de la fisiología del mismo, sino que además estudiamos la capacidad del espermatozoide de sintetizar NO. Los espermatozoides son

capaces de sintetizar NO a lo largo del proceso de capacitación y alcanzan la máxima producción de L-[ $^{14}$ C]citrulina a los 120-180 min. Esta producción de NO es específicamente inhibida por L-NAME pero no por aminoguanidina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de fertilización *in vitro* y Western Blot y sugieren nuevamente que la NO-sintasa del espermatozoide es de carácter constitutivo. Este dato es esperable porque por un lado, se sabe que el espermatozoide no tiene la capacidad de sintetizar proteínas *de novo* y por el otro, los espermatozoides se incuban en ausencia de inductores de la NO-sintasa inducible (e.g. citocinas o LPS).

Por otro lado, la progesterona es capaz de estimular directamente la síntesis de NO a espermatozoides capacitados. Este resultado confirma los ensayos de reacción acrosomal, donde evidenciamos la participación de la NO-sintasa espermática en la exocitosis mediada por progesterona. Creemos que sería interesante poder investigar si además de mediar los efectos de la progesterona, la NO-sintasa interviene en otros mecanismos inductores de la exocitosis acrosomal murina.

La arginina entra a las células por carriers que median la difusión facilitada y que son específicos para aminoácidos catiónicos. Este sistema de transporte se denomina sistema y<sup>+</sup> (White, 1985) y consiste en al menos dos proteínas de membrana llamadas CAT-1 y CAT-2B, las cuales se expresan diferencialmente en ratón (Bogle *y col.* 1992). En macrófagos activados por LPS, la producción de NO depende de la arginina extracelular y puede ser el factor limitante para la producción de NO (Sato *y col.* 1991; Takema *y col.* 1991). Contrariamente, las células endoteliales cultivadas *in vitro* dependen en menor medida de la concentración extracelular de L-arginina (Palmer *y col.* 1988a). En estas células la concentración intracelular de L-arginina varía entre 100-800  $\mu$ M (Baydoun *y col.* 1990). Se vió que luego de 24 hs de incubación en un medio libre de L-arginina, la concentración intracelular de este aminoácido es de 200  $\mu$ M y la producción de NO apenas se reduce (Baydoun *y col.* 1990), ya que el  $K_m$  para la isoforma III (endotelial) se determinó en 2.9  $\mu$ M. Consecuentemente, esta isoforma debe estar saturada en estas células, no observándose un aumento de la actividad con el agregado del sustrato. En nuestro sistema demostramos que la formación de NO depende del agregado de L-arginina al medio de incubación y que la síntesis de NO es lineal durante los primeros 20 min de capacitación, alcanzando el nivel máximo a los 120-180 min. Sin embargo, hasta el momento no se ha descripto el transporte transmembrana para la arginina ni la concentración intracelular

de L-arginina que posee el espermatozoide, dificultando la determinación del  $K_m$  y la  $V_{max}$  de la NO-sintasa espermática bajo nuestras condiciones experimentales, donde trabajamos con células vivas (condiciones *in vivo*).

Relacionando lo antes expuesto con el ensayo de fertilización *in vitro*, en donde el agregado de 5 mM de L-arginina al medio de capacitación no era capaz de aumentar el porcentaje de ovocitos fertilizados, se puede especular que: (1) el alto porcentaje de ovocitos fertilizados (87.1%) dificulta la observación de un aumento aún mayor de fertilización en presencia de L-arginina ó (2) un aumento en la formación de NO dado por la alta concentración de L-arginina (5 mM), no es capaz de mejorar los porcentajes de fertilización *in vitro*.

Corresponde aclarar que durante el transcurso del siguiente trabajo de tesis, algunos autores intentaron detectar la actividad de la NO-sintasa en espermatozoides murinos y humanos, pero no pudieron hacerlo. Una de las diferencias entre nuestro trabajo y el de estos autores (Zini y col. 1995; Schaad y col. 1995) es el medio de incubación que han utilizado (HAM-F 10). El medio de fertilización (MF) (Fraser y Drury, 1975) es un medio libre de arginina a diferencia del medio HAM-F 10, el cual posee L-arginina en alta concentración (1.2 mM). Por lo tanto, la presencia de L-arginina en el medio de incubación dificulta la observación de la formación de L-[ $^{14}$ C]citrulina a partir de L-[ $^{14}$ C]arginina como sustrato, dado que la concentración de arginina marcada que se utiliza es pequeña (5.0  $\mu$ M). Por otro lado, el uso de análogos competitivos de la NO-sintasa como el L-NAME o la NO<sub>2</sub>-arg deben agregarse en altas concentraciones para poder observar un efecto inhibitorio en un medio como el HAM-F 10.

Aunque en el trabajo de Schaad y col. (1995) no se puede detectar la actividad de la NO-sintasa en el espermatozoide, estos autores demuestran que el semen humano presenta un efecto inhibitorio sobre la actividad de la NO-sintasa neuronal. Este dato resulta sumamente interesante, ya que apoya indirectamente nuestras investigaciones. Es decir, si nosotros postulamos que la NO-sintasa del espermatozoide está involucrada en los mecanismos asociados al proceso de capacitación/reacción acrosomal es de esperar que exista algún factor en el plasma seminal que inhiba la actividad de la NO-sintasa y module directa ó indirectamente el estado funcional del espermatozoide.

Por otro lado, en trabajos previos relacionados con el proceso de fertilización, nosotros habíamos demostrado que el complejo cúmulus-ovocito era capaz de sintetizar prostaglandinas,

las cuales intervienen en los mecanismos relacionados a la función espermática (Viggiano y col. 1995). La PGE<sub>1</sub> actúa como un factor capacitante *in vitro* y aumenta el porcentaje de reacción acrosomal inducida por el ionóforo de Ca<sup>++</sup> (Herrero y col. 1995).

Ante estos resultados y conociendo la interacción existente entre el NO y las prostaglandinas (Rettori y col. 1993; Salvemini y col. 1993), nos cuestionamos si el espermatozoide murino era capaz de sintetizar prostaglandinas y si el NO modulaba dicha síntesis. Nuestros ensayos evidencian la actividad de las enzimas lipoxigenasa y ciclooxigenasa en la gameta masculina mediante la síntesis de PGE<sub>2</sub> y 5-HETE y además, el NO exógeno es capaz de estimular la actividad de estas enzimas. El hecho que el L-NAME y la hemoglobina no inhiban la síntesis basal de PGs e hidroxiácidos nos recuerda resultados semejantes en útero (Franchi y col. 1994) e hipotálamo (Rettori y col. 1993) de rata donde el efecto de la inhibición de la NO-sintasa sólo se observa en tejidos previamente estimulados con agonistas específicos.

Sin embargo, aunque no existen aún suficientes datos experimentales, sería interesante poder especular algunos mecanismos de acción relacionando las PGs y el NO con la exocitosis acrosomal murina. En este trabajo de tesis hemos demostrado que la progesterona estimula directamente la formación de NO sugiriendo que la NO-sintasa del espermatozoide media los efectos de la progesterona para inducir la reacción acrosomal. Dado que se ha demostrado que las PGs intervienen en el proceso de exocitosis (Zaneveld y col. 1991; Meizel y Turner, 1984) y que la progesterona estimula la síntesis de NO, sería interesante poder investigar si durante el evento de exocitosis inducido por progesterona, la síntesis de PGs espermáticas se ve estimulada por la progesterona vía NO-sintasa.

Otro mecanismo de acción podría ser la vía del GMPc. En otros tejidos se vio que el NO modula a la enzima guanilato ciclasa (Murad, 1994) aumentando la síntesis de GMPc independientemente de la vía de las PGs. Dado que se ha descripto la presencia de una guanilato ciclasa particulada en el espermatozoide (Radany y col. 1983; Bentley y col. 1986) y la participación del GMPc en la exocitosis acrosomal (Santos-Sacchi y Gordon, 1980), también sería interesante poder investigar si el NO sintetizado por la NO-sintasa del espermatozoide estimula la síntesis de GMPc en la reacción acrosomal inducida por progesterona.



Los resultados obtenidos y la presente discusión plantean nuevos interrogantes sobre la función que puede tener el óxido nítrico en el campo de la fertilización. En este sentido, las investigaciones que se desarrollan actualmente en nuestro laboratorio están orientadas por los siguientes objetivos:

- profundizar sobre los mecanismos de acción de la exocitosis acrosomal inducida por progesterona en los que participa el NO como mensajero intracelular. Específicamente se medirá la formación de GMPc y de prostaglandinas en espermatozoides capacitados e inducidos con progesterona.

- determinar si la NO-sintasa espermática interviene también en el evento de fusión.

- aislar y caracterizar mediante ensayos bioquímicos la NO-sintasa del espermatozoide murino.

- extender estos estudios a muestras humanas y explorar la distribución y funcionalidad de esta enzima en pacientes fértiles e infértiles. Creemos que estudios de esta naturaleza podrían contribuir a la comprensión del mecanismo de fertilización y a mejorar la calidad de vida de la población.

## **CAPITULO V**

### **Conclusiones**

. En este trabajo de tesis, evidenciamos por primera vez, la presencia de la NO-sintasa en el espermatozoide murino.

. Mediante ensayos farmacológicos determinamos que la NO-sintasa participa en el proceso de fertilización *in vitro* modulando tanto los parámetros de motilidad como de reacción acrosomal espontánea e inducida por progesterona. Es decir que la NO-sintasa es necesaria para que el espermatozoide exprese plenamente su capacidad fertilizante *in vitro*.

. A través de los ensayos inmunológicos evidenciamos que en el espermatozoide la NO-sintasa se localiza en el acrosoma y en la cola con un peso molecular de 140 kD. La NO-sintasa espermática parece ser una isoforma característica de carácter constitutivo.

. Mediante los ensayos cinéticos determinamos la formación de óxido nítrico durante el proceso de capacitación y demostramos que la progesterona estimula la síntesis de óxido nítrico en espermatozoides previamente capacitados.

. Finalmente, demostramos que los espermatozoides murinos sintetizan prostaglandinas e hidroxiácidos; esta síntesis es estimulada por un generador de óxido nítrico. Además, la inhibición de la NO-sintasa no modifica los niveles basales de estos metabolitos.

MARÍA BELEN HERRERO

Marcelo Viggiano

## **CAPITULO VI**

### **Bibliografía**

- . Abe, H. y Oikawa, T. (1991) *Anat. Rec.* **229**: 305.
- . Acott, T., Katz, D. y Hoskins, D. (1983) *Biol. Reprod.* **29**: 389.
- . Adenot, P., Szollosi, M., Geze, M., Renard, J. y Debey, P. (1991) *Mol. Reprod. Dev* **28**: 23.
- . Aitken, R.J. y Kelly, R.W. (1985) *J. Reprod. Fert.* **73**: 139.
- . Aitken, R. J., Clarkson J. S. y Fishel, S. (1989) *Biol. Reprod.* **40**: 183.
- . Aitken, R.J., Buckingham, D. y Fang, H.G. (1993) *J. Androl.* **14**: 132.
- . Allison, A.C. y Hartree, E.F. (1970) *J. Reprod. Fert.* **21**: 501.
- . Alvarez, J.G. y Storey, B.T. (1989) *Gamete Res.* **23**: 77.
- . Anderson, R., Feathergill, K. y Zaneveld, L.J.D. (1994) *J. Androl.* **15**: 61.
- . Austin, C. (1952) *Nature* **170**: 326.
- . Austin, C. (1960) *J. Reprod. Fert.* **3**: 310.
- . Baldi, E., Falsetti, C., Krausz, C., Gervasi, G., Carloni, V., Casano, R. y Forti, G. (1993) *Biochem. J.* **292**: 209.
- . Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E. y Austin, C. (1967) *J. Cell. Biol.* **34**: C1.
- . Barros, C., Capote, C., Perez, C., Crosby, J.A., Becker, M. y De Ioannes, A. (1992) *Biol. Res. (Chile)* **25**: 31.
- . Basuray, R., DeJonge, C.J. y Zaneveld, L.J.D. (1990) *J. Androl.* **11**: 47.
- . Bavister, B.D. (1989) *Gamete Res.* **23**: 139.
- . Baydoun, A.R., Emery, P.W., Pearson, J.D. y Mann, G.E. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 940.
- . Bedford, J.M. (1963) *Nature* **200**: 1178.
- . Bedford, J.M. (1967) *J. Reprod. Fert.* **13**: 365.
- . Bedford, J.M. (1969) *J. Reprod. Fert.* **supl.8**: 19.
- . Bedford, J.M. (1970) *Biol. Reprod.* **2 (suppl)**: 128.
- . Behrman, H. y Romero, R. (1992), edited by Jaffe y Yen, p. 238.

- . Bendz, A. (1977) *Prostaglandins* **13**: 355.
- . Bentley, J.K., Tubb, D.J. y Garbers, D.L. (1986). *J. Biol. Chem.* **261**: 14859.
- . Bergström, S. y Sjovall, J. (1957) *J. Acta Chem. Scan.* **11**: 1086.
- . Bergström, S., Dressler, F.R., Hage, R., Samuelsson, S. y Sjovall, J. (1963) *J. J. Biol. Chem.* **238**: 3555.
- . Bernal, A., Torres, J., Reyes, A. y Rosado, A. (1980) *Biol. Reprod.* **23**: 290.
- . Berrios, M. y Bedford, J.M. (1976) *J. Cell. Sci.* **39**: 1.
- . Berruti, G. (1991) *Cell. Biol. Int. Rep.* **15**: 917.
- . Blackmore, P.F. y Lattanzio, F.A. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 331.
- . Blackwell, G., Flower, F.J. y Vane, J.R. (1975) *Br. J. Pharmacol.* **55**: 233.
- . Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1029.
- . Bleil, J.D., Greve, J.M. y Wassarman, P.M. (1988) *Dev. Biol.* **128**: 376.
- . Boell, E.J. (1985) *J. Exp. Zool.* **234**: 105.
- . Boettger-Tong, H., Aarons, D., Biegler, B., Lee, T. y Poirier, G.R. (1992) *Biol. Reprod.* **47**: 716.
- . Bogle, R.G., Baydoun, A.R., Moncada, S., Pearson, J.D. y Mann, G.E. (1992) *Biochem. J.* **284**: 15.
- . Brackett, B. y Server, J. (1970) *Fertil. Steril.* **21**: 687.
- . Bredt, D.S. y Snyder, G.D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9030.
- . Bredt, D.S., Ferris, C.D. y Snyder, S.H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 10976.
- . Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 175.
- . Breitbart, H., Shalev, Y., Marcus, S. y Shemesh, M. (1995) *Hum. Reprod.* **10**: 2079.
- . Burnett, A., Ricker, D.D., Chamness, S.L., Maguire, M.P. y Crone, J.K. (1995) *Biol. Reprod.* **52**: 1.
- . Butler, A., Flitney, F. y Williams, D. (1995) *TiPS* **16**: 18.

- . Canteros, G., Rettori, V., Genaro, A., Suburo, A., Gimeno, M. y McCann, S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4246.
- . Chamberlin, M.E. y Dean, J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6014.
- . Chamness, S.L., Ricker, D.D., Burnett, A. y Chang, T.S. (1995) *Fertil. Steril.* **63**: 1101.
- . Chan, P. J., Corselli, J., Jacobson, J., Patton, W. y King, A. (1996) *Arch. Androl.* **36**: 25.
- . Chang, M. (1951) *Nature* **168**: 697.
- . Chang, M. (1959) *Nature* **184**: 466.
- . Charles, I.G., Palmer, R.M., Hickery, M.S., Moss, D.W. y Moncada, S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11419.
- . Cohen, M.S., Colin, M.J., Golimbu, M. y Hotchkiss, R.S. (1977) *Fertil. Steril.* **28**: 78.
- . Comporti, M. (1989) *Chem. Biol. Interac.* **72**: 1.
- . Cooper, T.G. (1984) *Gamete Res.* **9**: 55.
- . Corbett, J.A., Tilton, R.G., Chang, K., Hasan, K.S., Ido, Y. y McDaniel, M. (1992) *Diabetes* **41**: 552.
- . Coronel, C.E. y Lardy, H.A. (1992) *Mol. Reprod. Fertil.* **33**: 74.
- . Cran, D.G., Moor, R.M. y Irvine, S. (1988) *J. Cell. Sci.* **91**: 139.
- . Crozet, N. (1993), ed. Thibault, C., Levasseur, M.C. y Hunter, R.H. Paris, Elipses, p. 327.
- . Cuasnicú, P., Echeverria, F., Piazza, A. y Blaquier, J. (1984a) *J. Reprod. Fert.* **70**: 541.
- . Cuasnicú, P., Piazza, A. y Cameo, M.S. (1984b) *J. Reprod. Fert.* **72**: 467.
- . Cummins, J.M. y Yanagimachi, R. (1986) *Gamete Res.* **15**: 187.
- . Dacheux, J.L. y Paquignon, M. (1980) *Reprod. Nutr. Dev.* **20**: 1085.
- . Dawson, T.M., Bredt, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M. y Snyder, S.H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 797.
- . Dawson, T.M., Steiner, S.P., Dawson, V.L. y Snyder, S.H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9808.
- . De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1992) *J. Androl.* **13**: 379.

- . Deutch, D.S., Katz, D. y Overstreet, J. (1985) *Biol. Reprod.* **32**: 865.
- . Di Rosa, M., Radomsky, M., Carnuccio, R. y Moncada, S. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**: 1246.
- . Di Rosa, M., Ialenti, A., Iannaro, A. y Sautebin, L. (1996) *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids* **54**: 229.
- . Dickinson, R.G. (1976) *Aust. J. Exp. Biol. Sci.* **54**: 475.
- . Ding, A., Nathan, C., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J. y Srimal, S. (1990) *J. Immunol.* **145**: 940.
- . DuBois, R.N., Awad, J., Morrow, J. y Roberts, L.J. (1994) *J. Clin. Invest* **93**: 493.
- . Dudenhausen, E. y Talbot, P. (1982) *Gamete Res.* **6**: 257.
- . Dun, N.J., Dun, S.L., Wu, S.Y. y Förstermann, U. (1993) *Neurosci. Lett.* **158**: 51.
- . Duncan, M. y Fraser, L.R. (1993) *J. Reprod. Fert.* **97**: 287.
- . Eddy, E.M. (1988). *The Physiology of Reproduction*, ed. Knobil, E. y Neill, J. et al., Raven Press Ltd., New York, p. 27.
- . Ehrenwald, E., Parks, J. y Foote, R.H. (1988) *Gamete Res.* **20**: 145.
- . Flower, F.J. y Blackwell, G. (1976) *Biochem. Pharmacol.* **25**: 285.
- . Foresta, C., Rossato, M. y Di Virgilio, F. (1993) *Biochem. J.* **294**: 279.
- . Förstermann, U., Pollock, J.S., Ishii, K. y Murad, F. (1990) *Mol. Pharmacol.* **38**: 7.
- . Förstermann, U., Pollock, J.S., Schmidt, H.H. y Murad, F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1788.
- . Förstermann, U., Closs, E., Nakane, M., Pollock, J.S. y Kleinert, H. (1994) *Hypertension* **23**: 1121.
- . Franchi, A.M., Chaud, M., Rettori, V., Suburo, A., McCann, S.M. y Gimeno, M.A.F. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 539.
- . Fraser, L.R. (1977) *J. Exp. Zool.* **202**: 439.
- . Fraser, L.R. y Drury, L.M. (1975) *Biol. Reprod.* **13**: 513.
- . Fraser, L.R. (1985) *J. Reprod. Fert* **74**: 185.



- . Fraser, L.R. y McDermott, C.A. (1992) *J. Reprod. Fert* **96**: 363.
- . Friend, D.S. y Fawcett, D.W. (1974) *J. Cell. Biol.* **63**: 641.
- . Fuchs, D. (1973) *Mem. Soc. Endocrinol.* **20**: 163.
- . Furchgott, R.F. y Zawadzky, J.V. (1980) *Nature* **288**: 373.
- . Galser, K.B., Mobilio, D., Chang, J. y Senko, N. (1993) *TiPS* **14**: 92.
- . Geller, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Snyder, S.H. y Billiar, T.R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3491.
- . Goldblatt, M.W. (1933) *J. Soc. Chem. Ind.* **52**: 1056.
- . Gray, G.A., Schott, C., Julou-Schaeffer, G., Fleming, I. y Parrat, J.R. (1991) *Br. J. Pharmacol.* **103**: 1218.
- . Green, L.C., Tannenbaum, S.R. y Goldmann, P. (1981) *Science* **212**: 56.
- . Griveau, J.F., Dumanot, E., Callegari, J.P. y Le Lannou, D. (1995) *J. Reprod. Fert.* **103**: 17.
- . Gwatkin, R.B. y Williams, D. (1977) *J. Reprod. Fert.* **49**: 55.
- . Hamberg, M. (1972) *Eur. J. Pharmacol.* **6**: 135.
- . Hamilton, D. y Gould, R. (1980) *Anat. Rec.* **196**: 71.
- . Hammarström, S. (1983) *Leuk. Ann. Rew. Biochem* **52**: 355.
- . Harris, R., Ramwell, P. y Gilmer, P. (1979) *J. Ann. Rew. Physiol.* **41**: 653.
- . Hellström, W.J.G., Bell, M., Wang, R. y Sikka, S.C. (1994) *Fertil. Steril.* **61**: 1117.
- . Herrero, M.B., Viggiano, M., Boquet, M. y Gimeno, M.A.F. (1995) *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids* (en prensa).
- . Hibbs, J.B., Taintor, R.R. y Vavrin, Z. (1987) *Science* **235**: 473.
- . Hibbs, J.B., Tavor, R.R., Vovrin, V., Granger, D.L., Drapier, J.C., Anher, J.J. y Lancaster, J.R. (1990). *Nitric Oxide from L-arginine: A bioregulatory system*, Elsevier, Amsterdam, p. 189.
- . Hon Cheung, L. (1994) *NIPS* **9**: 134.
- . Howlett, S.K. y Bolton, V.N. (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.* **87**: 175.

- . Hunter, R., Cook, B. y Poyser, N. (1983) *Eur. J. Obstet. Gynecol.* **14**: 225.
- . Hyne, R.V., Edwards, K.P. y Smith, J.D. (1985) *Gamete Res.* **12**: 65.
- . Ignarro, L.J., Buga, G., Wood, K.S., Byrns, R.E. y Chauhuri, G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 9265.
- . Ignarro, J. (1990) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 535.
- . Infante, J. y Huszagh, V. (1985) *Mol. Cell. Biochem.* **69**: 3.
- . Ishijima, S., McCracken, J. y Witman, G. (1985) *J. Cell. Biol.* **101**: 364.
- . Jaffe, L.A., Sharp, A.P. y Wolf, D.P. (1983) *Dev. Biol.* **96**: 317.
- . Jasen, R. (1978) *Science* **201**: 349.
- . Jedlicki, A. y Barros, C. (1985) *Gamete Res.* **11**: 121.
- . Jeulin, C., Soufir, J.C., Weber, P., Laval-Martin, D. y Calvayrac, R. (1989) *Gamete Res.* **24**: 185.
- . Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Palaez, M., Crabo, B.G. y Zaneveld, L.J.D. (1984) *J. Reprod. Fert.* **70**: 219.
- . Joyce, C.L., Nuzzo, N.A., Wilson, J.R. y Zaneveld, L.J.D. (1987) *J. Androl.* **8**: 79.
- . Koehler, J.K. (1974) *J. Cell. Biol.* **67**: 647.
- . Koehler, J.K. (1981) *Arch. Androl.* **6**: 197.
- . Kopf, G. y Gerton, G.L. (1991). *The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction*, ed. Wassarman P.M., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 153.
- . Kovacs, A. y Foote, R.H. (1994) *Biotech. & Histochem.* **67**: 119.
- . Kurzrok, R. y Lieb, C.C. (1930) *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **26**: 268.
- . Kwon, N.S., Nathan, C., Gilker, C. y Stuehr, D.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 13442.
- . Laemmli, U. (1970) *Nature (London)* **227**: 680.
- . Lambert, L., Whitten, J., Baron, B., Cheng, H.C., Doherty, N.S. y McDonald, I.A. (1991) *Life Sci.* **48**: 69.
- . Laychock, S.G., Modica, M.E. y Cavanaugh, C.T. (1991) *Endocrinology* **129**: 3043.

- . Lechene, C. (1982) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **383**: 513.
- . Leung, A.Y. y Wong, P.Y. (1994) *NIPS* **9**: 31.
- . Leyton, L. y Saling, P.M. (1989) *Cell* **57**: 1123.
- . Longo, F.J., Lynn, J.W., McCulloh, D.H. y Chambers, E.L. (1986) *Dev. Biol.* **118**: 155.
- . Lowenstein, C.J. y Snyder, S.H. (1992) *Cell* **70**: 705.
- . Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M. y Snyder, S.H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9730.
- . Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- . Lugg, J.A., González-Cadavid, N.F. y Rajfer, J. (1995) *J. Androl.* **16** (1): 2.
- . Maragos, C., Morley, D., Wink, D. y Keefer, L. (1991) *J. Med. Chem.* **34**: 3242.
- . Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D. y Wishnok, J.S. (1988) *Biochem.* **27**: 8706.
- . Marletta, M.A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 12231.
- . Marsden, P., Heng, H., Scherer, S., Stewart, R. y Schappert, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 17478.
- . Mate, K. y Rodger, J. (1993) *J. Reprod. Fert.* **99**: 367.
- . Mayer, B., John, M. y Bohme, E. (1990) *FEBS Lett.* **277**: 215.
- . Mayer, B., John, M., Werner, E.R. y Bohme, E. (1991) *FEBS Lett.* **288**: 187.
- . Meistrich, M.L. y Reid, B.O. (1976) *Exp. Cell. Res.* **99**: 72.
- . Meizel, S. y Turner, K.O. (1984) *J. Exp. Zool.* **231**: 283.
- . Meizel, S. y Turner, K.O. (1991) *Mol. Cell. Endocrinol.* **11**: R1-R5.
- . Mennella, M.R. y Jones, R. (1980) *Biochem. J.* **191**: 289.
- . Michel, T., Li, G. y Busconi, L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6252.
- . Misko, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., Nickols, G.A. y Corbett, J.A. (1993) *Eur. J. Pharmacol.* **233**: 119.
- . Miyazaki, S. (1988) *Develop. Growth Differ.* **30**: 603.

- . Moller, C.C. y Wassarman, P.M. (1989) *Dev. Biol.* **132**: 103.
- . Mollova, M., Atanassov, B., Ivanova, M. y Kyurkchiev, S. (1992) *Anim. Reprod. Sci.* **29**: 275.
- . Moncada, S. (1992) *Acta Physiol. Scand.* **145**: 201.
- . Moore, H. (1979) *Int. J. Androl.* **2**: 449.
- . Moos, J., Faundes, D. y Kopf, G. (1995) *Hum. Reprod.* **10**: 2467.
- . Morse, D.E., Duncan, M., Hooker, N. y Morse, A. (1977) *Science* **196**: 298.
- . Mortillo, S. y Wassarman, P.M. (1991) *Development* **113**: 141.
- . Motta, A.B., Franchi, A.M. y Gimeno, M.A.F. (1995) *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids* (en prensa).
- . Murad, F. (1994) *Neurotransmissions* **10**: 1.
- . Myles, D.G. (1993) *Dev. Biol.* **158**: 35.
- . Nakano, J., Anggard, E. y Samuelsson, B. (1969) *B. Au. J. Biochem.* **11**: 386.
- . Nathan, C. (1992) *FASEB* **6**: 3051.
- . Newport, J.W. (1984) *Cell* **37**: 731.
- . Nichols, J. y Gardner, R.L. (1989) *Hum. Reprod.* **4**: 180.
- . Nunokawa, Y., Ishida, N. y Tanaka, S. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**: 89.
- . Oettlè, E.E. (1986) *Vet. Med.* **81**: 263.
- . Oettlè, E.E. y Soley, J. (1986) *Arch. Androl.* **17**: 145.
- . Oettlè, E.E. y Soley, J. (1988) *Vet. Med. Rev.* **59**: 28.
- . Olson, G.E. y Orgebin-Crist, M.C. (1982) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **383**: 372.
- . Orgebin-Crist, M.C. y Fournier-Delpech, S. (1982) *J. Androl.* **3**: 429.
- . Overstreet, J. y Cooper, G. (1979a) *J. Reprod. Fert.* **55**: 53.
- . Overstreet, J. y Cooper, G. (1979b) *J. Exp. Zool.* **209**: 97.
- . Palmer, R.M., Ferrige, A.G. y Moncada, S. (1987) *Nature* **327**: 524.

- . Palmer, R.M., Ashton, D.S. y Moncada, S. (1988a) *Nature* **333**: 664.
- . Palmer, R.M., Rees, D.D., Ashton, D.S. y Moncada, S. (1988b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 1251.
- . Parks, J. y Hammerstedt, R. (1985) *Biol. Reprod.* **32**: 653.
- . Perez Martinez, S., Franchi, A.M., Suburo, A., Herrero, M.B., Goin J.C. y Gimeno, M.A.F. (1996) *Life Sci.* (en prensa).
- . Perreault, S.D., Barbee, R.R. y Slott, V.L. (1988) *Dev. Biol.* **125**: 181.
- . Persson, M.G., Gustaffson, L.E., Wilklund, N.P., Moncada, S. y Hedquist, M. (1990) *Acta Physiol. Scand.* **140**: 449.
- . Peterson, R. y Russell, L. (1985) *Tissue Cell* **17**: 769.
- . Piper, P. y Vane, J.R. (1971) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **180**: 363.
- . Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H. y Murad, F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10480.
- . Primakoff, P., Hyatt, H. y Tredick-Kline, J. (1987) *J. Cell. Biol.* **104**: 141.
- . Radany, E.W., Gerzer, R. y Garbers, D.L. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 8346.
- . Ramwell, P., Leovey, E. y Sintetos, A. (1977) *Biol. Reprod.* **16**: 70.
- . Ravnik, S.E., Albers, J.J. y Muller, C.H. (1993) *Fertil. Steril.* **59**: 629.
- . Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., Hodson, H. y Moncada, S. (1990) *Br. J. Pharmacol.* **101**: 746.
- . Rengasamy, A. y Johns, A.R. (1994) *Mol. Pharmacol.* **44**: 124.
- . Rettori, V., Belova, N., Dees, W.L., Nyberg, C.L., Gimeno, M.A.F. y McCann, S.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10130.
- . Richelsen, B. y Beck-Nielsen, H. (1984) *J. Clin. Endocrinol.* **59**: 7.
- . Rochwerger, L., Cohen, D. y Cuasnicú, P. (1992) *Dev. Biol.* **153**: 83.
- . Rochwerger, L. y Cuasnicú, P. (1992) *Mol. Reprod. Dev.* **31**: 34.
- . Rodger, J. y Bedford, J.M. (1982) *J. Reprod. Fert.* **64**: 171.
- . Rogers, B. J. y Parker, R. (1991) *J. Androl.* **12**: 152.

- . Roldán, E.R.S., Murase, T. y Shi, Q.X. (1994) *Science* **266**: 1578.
- . Rosiere, T.K. y Wassarman, P.M. (1992) *Dev. Biol.* **154**: 309.
- . Roy, A. C. y Ratnam, S. S. (1992) *Mol. Reprod. Dev.* **33**: 303.
- . Ruknudin, A. y Silver, I.A. (1990) *Mol. Reprod. Dev.* **26**: 63.
- . Saling, P.M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6231.
- . Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J.L., Siebert, K., Currie, M.G. y Needleman, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7240.
- . Salvemini, D., Settle, S.L., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G. y Needleman, P. (1995) *Br. J. Pharmacol.* **114**: 1171.
- . Samuelsson, B. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**: 3229.
- . Samuelsson, B., Ganström, E., Green, L.C. y Hamberg, M. (1971) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **180**: 138.
- . Santos-Sacchi, J. y Gordon, M. (1980) *J. Cell. Biol.* **85**: 798.
- . Sato, K. (1979) *J. Exp. Zool.* **210**: 353.
- . Sato, H., Ishii, T., Sugita, Y. y Bannai, S. (1991) *Biochem. Biophys. Acta* **100**: 46.
- . Schaad, N. C., Zhang, X. Q., Campana, A. y Schorderetslatkine, S. (1996) *Hum. Reprod.* **11**: 561.
- . Schlegel, W., Rotermund, S., Farber, G. y Nieschlag, E. (1981) *Prostaglandins* **21**: 87.
- . Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Nakane, M., Förstermann, U. y Murad, F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 365.
- . Schmidt, H.H., Gagne, G.D., Nakane, M., Pollock, J.S. y Murad, F. (1992) *J. Histochem. Cytochem.* **40**: 1439.
- . Schmidt, H.H. y Walter, U. (1994) *Cell* **78**: 919.
- . Schuetz, A.W. y Dubin, N.H. (1981) *Endocrinology* **108**: 457.
- . Schulz, R. y Triggle, C. (1994) *TiPS* **15**: 255.
- . Sessa, W.C., Barber, C. y Lynch, K. (1993) *Cir. Res.* **72**: 921.

- . Shalev, Y., Shemesh, M., Levinshal, T., Marcus, S. y Breitbart, H. (1994) *J. Reprod. Fert.* **101**: 405.
- . Shalgi, R., Kaplan, R., Nebel, L. y Kraicer, P. (1981) *J. Exp. Zool.* **217**: 399.
- . Shi Q. X. y Roldán, E.R.S. (1995) *Biol. Reprod.* **52**: 373.
- . Shur, B.D. y Hall, N.G. (1982) *J. Cell. Biol.* **95**: 547.
- . Sikka, S.C., Rajasekaran, M. y Hellström, W.J.G. (1995) *J. Androl.* **16**: 464.
- . Singer, S.L., Lambert, H., Cross, N.L. y Overstreet, J. (1985) *Gamete Res.* **12**: 291.
- . Smith, T.T. y Yanagimachi, R. (1991) *J. Reprod. Fert.* **91**: 567.
- . Southan, G.J., Szabó, C., O'Connor, M.P., Salzman, A.L. y Thiernemann, C. (1995) *Eur. J. Pharmacol.* **291**: 311.
- . Springall, D., Riveros-Moreno, V., Buttery, L., Suburo, A., Bishop, A.E., Merret, M., Moncada, S. y Polak, J. (1992) *Histochemistry* **98**: 259.
- . Stamler, J.S. (1994) *Cell* **78**: 931.
- . Stojanoff, A., Bourne, H., Andrews, A.G. y Hyne, R.V. (1988) *Gamete Res.* **21**: 297.
- . Stuehr, D.J. y Marletta, M.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7738.
- . Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F. y Nathan, C. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7773.
- . Suburo, A., Chaud, M., Franchi, A., Polak, J. M. y Gimeno, M.A.F. (1995). *Biol. Reprod.* **52**: 631.
- . Suzuki, F. y Yanagimachi, R. (1989) *Gamete Res.* **23**: 335.
- . Swann, K. (1990) *Development* **110**: 1295.
- . Takema, M., Inaba, K., Uno, K., Kakiyama, K.I., Tawara, K. y Muramatsu, S. (1991) *J. Immunol.* **146**: 1928.
- . Talbot, P., DiCarantonio, G., Zao, P.Z., Penkala, J. y Haimo, L.T. (1985) *Dev. Biol.* **108**: 387.
- . Tarín, J.J. y Trounson, A. (1994) *Reprod. Fertil. Dev.* **6**: 33.
- . Tash, J.S. y Bracho, G. (1994) *J. Androl.* **15**: 505.
- . Taylor, P.L. y Kelly, R.W. (1974) *Nature* **250**: 665.

- . Tesarik, J., Pilka, L., Drahorad, J., Cechova, D. y Veselsky, L. (1988) *Hum. Reprod.* **3**: 129.
- . Tesarik, J., Moos, J. y Mendoza, C. (1993) *Endocrinology* **133**: 328.
- . Thibault, C., Dauzier, L. y Winterberger, S. (1954) *C. R. Soc. Biol.* **148**: 789.
- . Tomlinson, M.J., East, S. J., Barratt, C. L., Bolton, A. E. y Cooke, I. D. (1992) *Am. J. Reprod. Immunol.* **27**: 89.
- . Towbin, H., Staehelin, F. y Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3116.
- . Tracey, W.R., Pollock, J.S., Murad, F., Nakane, M. y Förstermann, U. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**: C22-8.
- . Uehara, T. y Yanagimachi, R. (1977) *Biol. Reprod.* **16**: 315.
- . Uguz, C., Vredenburg, W.L. y Parrish, J.J. (1994) *Biol. Reprod.* **51**: 1031.
- . Urch, U.A., Wardrip, N.J. y Hedrick, J.L. (1985) *J. Exp. Zool.* **233**: 479.
- . Urch, U.A. y Patel, H. (1991) *Development* **111**: 1165.
- . Van Voorhis, B.J., Dunn, M., Snyder, G.D. y Weiner, C.P. (1994) *Endocrinology* **135**: 1799.
- . Verkuyl, D. (1988) *Br. J. Obstet. Gynecol.* **95**: 933.
- . Viggiano, M., Herrero, M.B., Cebal, E. y Gimeno, M.A.F. (1995) *Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids* **53**: 261.
- . Villar, A., D'Ocon, D. y Anselmi, E. (1985) *Prostaglandins* **30**: 491.
- . Villarroja, S. y Scholler, R. (1987) *J. Reprod. Fert.* **80**: 545.
- . Virji, N., Phillips, D. y Dunbar, B. (1990) *Mol. Reprod. Dev.* **25**: 339.
- . Visconti, P. E., Bailey, J., Moore, G., Pan, D., Olds'Clarke, P. y Kopf, G.S. (1995) *Development* **121**: 1129.
- . Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q.W. y Nathan, C. (1993) *J. Exp. Med.* **178**: 605.
- . Volglmayr, J.K. y Sawyer, F.R. (1986) *J. Reprod. Fert.* **78**: 315.
- . Von Euler, U.S. (1936) *J. Physiol.* **88**: 213.
- . Wakayama, T., Ogura, A., Suto, J., Matsubara, Y., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. y Yanagimachi, R. (1996) *J. Reprod. Fert.* **107**: 97.



- . Ward, C.R. y Storey, B.T. (1984) *Dev. Biol.* **104**: 287.
- . Wassarman, P.M. (1991) *Int. Rev. Cytol.* **130**: 85.
- . Weinberg, J.B., Doty, E., Bonaventura, J. y Haney, A.F. (1995) *Fertil. Steril.* **64**: 408.
- . Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A. y Wachter, H. (1990) *J. Exp. Med.* **172**: 1599.
- . Whitaker, M. y Patel, R. (1990) *Development* **108**: 525.
- . White, K.A. y Marletta, M.A. (1992) *Biochemistry* **31**: 6627.
- . White, M.F. (1985) *Biochem. Biophys. Acta* **822**: 355.
- . Wilcox, C.S., Schmidt, H.H., Murad, F., Gross, S.S., Taylor, P.L., Levi, R. y Welch, W.J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1123.
- . Wong, P.Y. y Uchendu, C. (1990) *J. Endocrinol.* **125**: 457.
- . Xie, Q.W., Cho, H.J. y Nathan, C. (1992) *Science* **256**: 225.
- . Xu, W.M., Gorman, P., Sheer, D. y Emson, P. (1993a) *Cytogenet. Cell. Genet.* **64**: 62.
- . Xu, W.M., Charles, I.G., Moncada, S., Gorman, P., Liu, L. y Emson, P. (1993b) *Endothelium* **1**: S4.
- . Yanagimachi, R. (1982) *Gamete Res.* **5**: 323.
- . Yanagimachi, R., Kamiguchi, K., Mikano, K., Suzuki, F. y Yanagimachi, H. (1985) *Am. J. Anat.* **172**: 317.
- . Yanagimachi, R. (1994) *Mammalian Fertilization*, ed. Knobil, E. y Neill, J., Raven Press Ltd., New York, p. 189.
- . Young, L., Hinton, B. y Gould, F. (1985) *Biol. Reprod.* **32**: 399.
- . Yudin, A., Cherr, G.M. y Katz, D. (1988) *Cell. Tissue Res.* **251**: 555.
- . Zaneveld, L.J.D., Mack, S.R., Han, H.L., DeJonge, C.J. y Basuray, R. (1991) *Role of Arachidonic Acid metabolism in the Human Sperm Acrosome Reaction*, ed. Baccetti, B., Raven Press, New York, p. 277.
- . Zini, A., De Lamirande, E. y Gagnon, C. (1995) *J. Androl.* **16**: 424.